Monosaccharidumwandlung und Chitinsynthese bei dem Flußkrebs Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Lang

aus Stuttgart

1970

Monosaccharidumwandlung und Chitinsynthese bei dem Flußkrebs Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Lang

aus Stuttgart

1. Referent: Prof. Dr. K. Urich

2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 1970

Tag der Promotion: 16. JULI 1970

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin ausgeführt. Ich bin Herrn Prof. Dr. Urich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut, für die Anregung zu dieser Arbeit, für die großzügige Förderung sowie für die Kritik bei der Abfassung dieser Dissertation sehr zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt gleichfalls den übrigen Institutsangehörigen für die Unterstützung, besonders bei der Durchführung experimenteller Arbeiten. Ebenso danke ich Prof. Dr. Belitz und Dipl. Mathematiker Köhler vom Institut für Genetik der Freien Universität für ihren Rat bei der statistischen Bearbeitung der Versuchsergebnisse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0051

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungen 5

Einleitung 7

I Umwandlung von Monosacchariden

Material und Methodik

1 Tiermaterial 10
2 Präparation der Gewebe 10
3 Bestimmung der Enzymaktivitäten 11
4 Proteinbestimmung 11
5 Allgemeines zur Ausführung der Enzymtests ... 11
6 Bestimmung der einzelnen Enzyme 12
7 Systematische Fehler 18
8 Anzahl der Messungen - Statistik 19

Ergebnisse

1 Enzyme des Pentosephosphat-cyclus 20
2 Enzyme des Galactosestoffwechsels 24
3 Oxydoreductasen 26
4 Aldolasen 28
5 Phosphoglucosamin-isomerase 30

Diskussion

1 Literaturübersicht 32
2 Stoffwechsel der Fructose 34
3 Stoffwechsel der Galactose 36
4 UDPG-dehydrogenase und Glucuronsäure-stoffwechsel 37
5 Bakterielle Polyol-dehydrogenasen 37
6 Phosphoglucosamin-isomerase 37
7 Pentosephosphat-cyclus 38
8 Charakterisierung der einzelnen Organe 41

II Chitinsynthese

Material und Methodik

1 Tiermaterial 45

2 Chitinbestimmung 46

3 Enzymaktivitätsbestimmung, Proteinbestimmung und Statistik 47

Ergebnisse 47

Diskussion

1 Einbau von Glucose-U-^{14}C in Chitin und Chitingewicht 50

2 Chitinsynthese bei Zwischenhäutungstieren 52

3 Enzyme der Chitinsynthese 52

4 Zeitlicher Verlauf der Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivitäten, der Chitineinbauraten und der Chitingewichte 53

5 Regulation der Chitinsynthese und Kohlenhydratstoffwechsel zur Zeit der Häutung 55

Zusammenfassung 61

Literaturverzeichnis 63

Anhang

1 Reaktionsschema der untersuchten Enzyme sowie einiger anderer damit in Beziehung stehender Reaktionen

2 Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
A-Gm-6-P	= N-Acetylglucosamin-6-phosphat
DHAP	= Dihydroxyaceton-phosphat
EDTA	= Äthylendiamin-tetraessigsäure
E-4-P	= D-Erythrose-4-phosphat
FDP	= D-Fructose-1,6-diphosphat
F-1-P	= D-Fructose-1-phosphat
F-6-P	= D-Fructose-6-phosphat
GAP	= Glycerinaldehyd-3-phosphat
Ga-1-P	= D-Galactose-1-phosphat
Gly-1-P	= Glycerin-1-phosphat
Gm-6-P	= D-Glucosamin-6-phosphat
G-1-P	= D-Glucose-1-phosphat
G-6-P	= D-Glucose-6-phosphat
M-1-P	= D-Mannit-1-phosphat
NAD^+	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, red.
-P	= organisches Phosphat
P_i	= anorganisches Phosphat
PP	= Pyrophosphat
6-PG	= D-6-Phosphogluconat
6-PGL	= D-6-Phosphogluconolacton
R-5-P	= D-Ribose-5-phosphat
Ru-5-P	= D-Ribulose-5-phosphat
S-6-P	= D-Sorbit-6-phosphat
S-7-P	= Sedoheptulose-7-phosphat
Tris	= Tris (hydroxymethyl) aminomethan
UDP	= Uridin-5'-diphosphat
UDPG	= Uridin-5'-diphospho-glucose
UDPGa	= Uridin-5'-diphospho-galactose
UTP	= Uridin-5'-triphosphat

Ald.	= Fructosediphosphataldolase
CS	= Citratsynthase
GDH	= Glycerin-1-phosphat-dehydrogenase
G6PDH	= Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
1PFA	= 1-Phosphofructaldolase
6PGDH	= 6-Phosphogluconat-dehydrogenase
PGI	= Phosphoglucosamin-isomerase
SDH	= Sorbitdehydrogenase
TA	= Transaldolase
TIM	= Triose-phosphat-isomerase
TK	= Transketolase
UDPGDH	= Uridin-5'-diphospho-glucose-dehydrogenase
UDPGEP	= Uridin-5'-diphospho-glucose-4-epimerase
Uridyltransf.	= Hexose-1-phosphat-uridyl-transferase

EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Vorgängen des Kohlenhydratstoffwechsels bei einem Vertreter der Crustaceen, dem Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque. KELLER (1964) stellte fest, daß bei Orconectes limosus Glykolyse und Citronensäure-cyclus nach dem von Wirbeltieren bekannten Schema ablaufen. JANTZEN (1967) konnte die Gültigkeit dieses Schemas auf die Glykogenese und Glykogenolyse ausdehnen und zeigte, daß der Trehaloseabbau wie bei den Insekten verläuft. SPECK (1967) stellte bei der Untersuchung des Kohlenhydratspektrums fest, daß der Kohlenhydratgehalt von Orconectes zwar relativ gering, das Kohlenhydratspektrum jedoch mit wenigstens 14 Substanzen einschließlich der Polysaccharidbausteine außerordentlich komplex ist. Die wechselseitige Umwandlung der verschiedenen Monosaccharide wurde bisher nur in geringem Umfang bei den Crustaceen untersucht. Nachweis und Bestimmung der beteiligten Enzyme war eine Aufgabe dieser Arbeit. Die Ergebnisse von SPECK und URICH (1969) über die eindrucksvolle Umschaltung des Stoffwechsels nach der Häutung in Richtung Chitinsynthese induzierte das zweite Thema dieser Arbeit über die Mechanismen, die diese Umsteuerung des Stoffwechsels bewirken.

Die Untersuchungen stehen im Rahmen eines am hiesigen Institut durchgeführten Arbeitsprogrammes, das die Analyse des Stoffwechsels eines Vertreters der decapoden Crustaceen zum Ziel hat. Die Grundgedanken des Programms wurden von URICH mehrfach formuliert (1958, 1961, 1964); die bisherigen Ergebnisse wurden kürzlich von dem selben Autor zusammengefaßt (1968).

Die schon von KELLER (1964) aufgeworfene Frage nach dem Informationswert von in Rohextrakten gemessenen Enzymaktivitäten ist auch für diese Arbeit höchst aktuell. BETZ et al. (1965) und PETTE (1968) stimmen insofern überein, wenn sie erklären, daß der in vitro gemessenen Aktivität eines Enzyms nur geringe Aussagekraft zukomme - sie könne nur einen Hinweis dafür liefern, daß das Enzym überhaupt vorhanden sei. PETTE stellt dann aber fest: "Auf der Basis der vergleichenden Analyse liefert sie aber höchst aufschlußreiche Einblicke in die Organisation des Enzymmusters und damit in die quantitative Korrelation metabolischer Funktionen." Interessant ist, daß GRASZYNSKI (1968c) bei Orconectes aus Untersuchungen in vivo

mit Tracern schließen konnte, daß in vitro gemessene Hexokinaseaktivitäten der Geschwindigkeit des Kohlenhydratumsatzes im lebenden Tier proportional sind. Für die Aktivitäten der Glykolyse bei der Schmeißfliege Lucilia trifft dies jedoch nicht zu (CROMPTON und BIRT 1969).

Bei der Vielzahl der Monosaccharide beim Flußkrebs lag es nahe, die bei der Umwandlung beteiligten Enzyme zu untersuchen. Durch Bestimmung der Enzyme des Pentosephosphat-cyclus sollte festgestellt werden, in welchem Maße dieser Stoffwechselweg Glucose abzubauen und Tetrosen, Pentosen, Hexosen und Heptosen ineinander umzuwandeln vermag. Vier Enzyme des Pentosephosphat-cyclus boten sich zur Messung an: die beiden den Cyclus einleitenden Enzyme, die Glucose-6-P-dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-dehydrogenase, welche die oxydativen Schritte des Pentosephosphat-cyclus katalysieren und aus Glucosephosphat ein Pentosephosphat entstehen lassen. Außerdem die Transaldolase und Transketolase, die einen Dihydroxyacetonrest bzw. ein C_2-Fragment zu übertragen vermögen und durch Kombination ihrer Reaktionen mannigfache Umwandlungen der Zucker ineinander ermöglichen, so auch die Rückverwandlung in Hexosephosphate.

Eine bei Crustaceen noch nicht untersuchte Frage war, ob sich auch die Umwandlung von Glucose in Galactose und umgekehrt in das allgemein bekannte Stoffwechselschema einfügen läßt. Zur Klärung wurden die Hexose-1-P-uridyl-transferase und die UDP-glucose-4-epimerase bestimmt. Durch Zusammenwirken der beiden Enzyme kann Galactose-1-P in Glucose-1-P umgewandelt werden.

Durch Einsetzen verschiedener Zucker und Zuckerphosphate wie Glucose, Fructose, Galactose oder Mannose bzw. Glucose-6-P oder Fructose-6-P unter Verwendung der Cosubstrate NAD^+, $NADP^+$, NADH oder NADPH wurde das Vorkommen einiger Oxydoreductasen getestet, die vom allgemeinen Stoffwechselschema und teilweise nur von Bakterien her bekannt sind. Dabei sollte auch versucht werden, die UDP-glucose-dehydrogenase als Schlüsselenzym des Glucuronatwegs zu bestimmen.

Interessant schien ein Vergleich der beim Fructoseabbau

eine Schlüsselstellung einnehmenden 1-Phosphofructaldolase mit der Fructosediphosphataldolase. In der Regel setzen beide Enzyme Fructose-1-P und Fructose-1,6-di-P um, allerdings mit sehr verschiedenen Geschwindigkeiten und unterschiedlichen Michaeliskonstanten.

Zur Untersuchung der Chitinsynthese wurde die Aktivität der den Chitinaufbau einleitenden Phosphoglucosamin-isomerase in verschiedenen Organen bei frisch gehäuteten Tieren und bei Zwischenhäutungstieren gemessen. An einer größeren Zahl von Versuchstieren, welche sich in definierten Häutungsstadien befanden, wurde die in vitro im Integumentgewebe gemessene Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivität durch in vivo-Bestimmung der Einbaurate radioaktiv markierter Glucose in Chitin ergänzt. Zusätzlich wurde an den selben Tieren eine Chitinbestandsaufnahme vorgenommen.

I UMWANDLUNG VON MONOSACCHARIDEN

Material und Methodik

1 Tiermaterial

Objekt dieser Untersuchungen war der Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque (=Cambarus affinis Say). Die Tiere stammten aus der Havel bei Berlin-Spandau; sie waren von wechselnder Größe, wogen aber immer mindestens 13 g. Nach dem Fang wurden sie möglichst 2 - 3 Tage im Keller des Instituts unter fließendem Leitungswasser gehalten und meist innerhalb von vier Wochen zum Versuch verwendet; in dieser Zeit wurden die Tiere regelmäßig mit Herzfleisch gefüttert. Um Einflüsse der Häutung auszuschalten, wurden nur Tiere mit festem Integument und ohne Gastrolithen verwendet.

2 Präparation der Gewebe

Die Tiere wurden entweder durch Zerstören des Bauchmarks getötet oder 20 min lang in einer Tiefkühltruhe belassen. Die Organe wurden schnell entnommen, auf Filtrierpapier kurz abgetupft und in dem zur späteren Messung benutzten Puffer mittels eines Potter-Elvejhem-Homogenisators mit Teflonstempel oder eines Glashomogenisators nach DOUNCE et al. (1955) unter Eiskühlung homogenisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Homogenate 30 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände bis zu Beginn der Messung unter Eiskühlung aufbewahrt. Zur Gewinnung von Blutserum wurden den Tieren vor der Tötung 1-2 Peraeopoden abgeschnitten. Die austropfende Hämolymphe wurde in einem eisgekühlten Zentrifugenglas aufgefangen und das sich bildende Gerinnsel abzentrifugiert. Mit Antennendrüse wird der Exkretionsapparat ausschließlich der Harnblase, mit Integumentgewebe die Auskleidung der die Kiemenhöhle bedeckenden Carapaxhälften bezeichnet. Vom Magen wurden nur die weichhäutigen Teile verwendet. Der Enddarm wurde durch Ausstreichen gereinigt.

3 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der von WARBURG und CHRISTIAN (1936) angegebenen Methode des optischen Tests. Sie ist anzuwenden, wenn die Reaktion mit der Oxydation von NADH oder NADPH bzw. mit der Reduktion von NAD^+ oder $NADP^+$ gekoppelt ist. Der Reaktionsverlauf wurde bei 366 nm und 25°C mit einem Eppendorf-Photometer (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) gemessen und mittels eines Philips-Kompensationsschreibers mit Linearisierungsglied registriert. Bei 366 nm entspricht einer Extinktionsänderung von 0,100 einem Substratumsatz von 30,3 nMol pro ml Küvetteninhalt und 1 cm Schichtdicke. Schwache Aktivitäten, die nicht im direkten optischen Test gemessen werden konnten, wurden mit der "Endwertmethode" bestimmt, d.h. nach Inkubation von bestimmter Dauer wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 100°C gestoppt und die Menge des gebildeten Produkts durch enzymatische Analyse bestimmt.

Die Enzymaktivität wird angegeben in nMol (10^{-9} Mol) umgesetztes Substrat pro mg Protein und Minute (spezifische Aktivität). Dies entspricht Tausendsteln der internationalen Einheit (1 U = 1 µMol/min), also mU/mg Protein.

4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (1951) mit dem Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz unter Benutzung einer Eichkurve, die mit kristallisiertem Rinder-Serumalbumin (Sigma, St. Louis, USA) aufgestellt worden war.

5 Allgemeines zur Ausführung der Enzymtests

Für jedes Enzym wurde die optimale Substrat- und Cosubstratkonzentration bestimmt und der Bereich ermittelt, in dem Proportionalität zwischen Aktivität und Enzymkonzentration sichergestellt war. Bei Enzymen, die keinen linearen Kurvenverlauf zeigten, ergab sich die Anfangsgeschwindigkeit aus der Steigung der an den Anfangsteil der gekrümmten Umsatzkurve gelegten Tangente. In Vorversuchen wurden Doppelbestimmungen im Abstand von 45 bis 60 min ausgeführt, um eine mögliche Inaktivierung des Enzyms zu überprüfen. Vor dem Start der

Reaktion, der in der Regel durch Zugabe des Substrats erfolgte, wurde der endogene Umsatz beobachtet. Dieser sank meist auf einen zu vernachlässigenden Wert ab; verlief er über längere Zeit linear, wurde der endogene Umsatz von der Gesamtreaktion abgezogen.

Die verwendeten Chemikalien waren von p.a.-Qualität. Die Hilfsenzyme, Substrate und Cosubstrate wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Boehringer, Mannheim bezogen.

6 Bestimmung der einzelnen Enzyme

Die Konzentrationsangaben der Komponenten in den Bestimmungsansätzen bedeuten Endkonzentrationen (mMol/l).

Enzyme des Pentosephosphat-cyclus

Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH, EC:1.1.1.49, D-Glucose-6-phosphat:NADP-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Aktivität der G6PDH wurde von KELLER (1964) übernommen. Sie beruht auf folgender Reaktion:
G-6-P + $NADP^+$ = 6-PGL + NADPH
Bestimmungsansatz:
Glycylglycin/KOH-Puffer (pH 7,6) 30; $MgCl_2$ 20; $NADP^+$ 0,42;
G-6-P 2,4
Gesamtvolumen: 1 ml
Messungen im November

Phosphogluconat-dehydrogenase (6PGDH, EC:1.1.1.44, 6-Phospho-D-gluconat: NADP-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach PONTREMOLI und GRAZI (1966). Sie beruht auf folgender Reaktion:
6-PG + $NADP^+$ = Ru-5-P + CO_2 + NADPH
Bestimmungsansatz:
Glycylglycin/KOH-Puffer (pH 7,6) 30; $MgCl_2$ 20; $NADP^+$ 0,42;
6-PG 2,4
Gesamtvolumen: 1 ml
Bei der Mitteldarmdrüse konnte auch mit Eialbuminzusatz keine Aktivität gefunden werden - anorganische Inhibitoren scheiden als Ursache aus. Mg^{2+}-Ionen erwiesen sich bei den Messungen im Frühjahr für die 6PGDH-Aktivität nur schwach aktivierend,

zum Teil zeigten sie keine Wirkung. Dagegen bewirkten sie im Juni und November bei allen untersuchten Organen eine m.o.w. starke Hemmung und wurden daher bei diesen Messungen weggelassen. Na-EDTA ergab nur unwesentliche Aktivitätsänderungen.

Transaldolase (TA, EC: 2.2.1.2, Sedoheptulose-7-phosphat: D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Dihydroxyaceton-transferase)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach VENKATARAMAN und RACKER (1961) und ROWLEY et al. (1964). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

F-6-P + E-4-P = S-7-P + GAP
GAP = DHAP (TIM)
DHAP + NADH = Gly-1-P + NAD^+ (GDH)

Bestimmungsansatz:
Glycylglycin/KOH-Puffer (pH 7,4) 25; NADH 0,24; F-6-P 9,8; E-4-P (Calbiochem, Los Angeles, USA) 1,3; TIM/GDH (10 mg/ml) 10 µl

E-4-P, Dimethyl-acetal wurde nach einer Vorschrift des Herstellers hydrolysiert.
Der von verschiedenen Autoren vorgeschlagene EDTA-Zusatz ergab keine wesentlichen Aktivitätsänderungen.
Gesamtvolumen: 1 ml
Aktivitätsbestimmungen im April

Transketolase (TK, EC: 2.2.1.1, Sedoheptulose-7-phosphat: D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Glykolaldehyd-transferase)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach DE LA HABA et al. (1955). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

R-5-P + X-5-P = S-7-P + GAP
GAP = DHAP (TIM)
DHAP + NADH = Gly-1-P + NAD^+ (GDH)

Bestimmungsansatz:
Glycylglycin/KOH-Puffer (pH 7,6) 35; $MgCl_2$ 3; NADH 0,4; Thiaminpyrophosphorsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) 0,2; R-5-P etwa 4,5; X-5-P etwa 1,2; TIM/GDH (10 mg/ml) 10 µl

X-5-P wurde nach einer Vorschrift von BRUNS et al. (1958) mit einem 1:100 verdünnten Hämolysat gewonnen.
Gesamtvolumen: 1 ml

Bei der Mitteldarmdrüsenmessung wurde dem Homogenat 1% Eialbumin zugesetzt.
Aktivitätsbestimmungen im Juli

Enzyme des Galactosestoffwechsels

Hexose-1-phosphat-uridyltransferase (EC: 2.7.7.12, UDP-glucose: D-Galactose-1-phosphat-uridyltransferase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach MAXWELL et al. (1962). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:
Ga-1-P + UDPG = UDPGa + G-1-P
G-1-P = G-6-P (Phosphoglucomutase)
G-6-P + $NADP^+$ = 6-PGL + NADPH (G6PDH)

Bestimmungsansatz:
Glycin/KOH-Puffer (pH 8,7) 100 (10 mM an Mercaptoäthanol); $MgCl_2$ 0,7; UDPG 0,65; Ga-1-P 0,65; Phosphoglucomutase (2 mg/ml) 10 µl; Homogenat (5000 g-Überstand)

Anwendung der "Endwertmethode": Inkubationsdauer dieses Ansatzes je nach Organ zwischen 4 und 20 min. Stoppen der Reaktion durch 90 sec Erhitzen im kochenden Wasserbad. Abzentrifugieren des Niederschlags. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Messung eingeleitet durch Zugabe von: $NADP^+$ 0,8; G6PDH (1 mg/ml) 10 µl
Gesamtvolumen: 0,4 - 0,6 ml
Messungen im September und Oktober

UDP-glucose-4-epimerase (EC: 5.1.3.2)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach MAXWELL et al. (1962). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:
UDPGa = UDPG
UDPG + $2NAD^+$ = UDP-glucuronat + 2 NADH (UDPG-DH)

Bestimmungsansatz:
Glycin/KOH-Puffer (pH 8,7) 300; UDPGa (Sigma, St. Louis, USA) 0,45; Homogenat (5000 g-Überstand)

Anwendung der "Endwertmethode" (s.o.): NAD^+ 2; UDPG-Dehydrogenase (Sigma Type III, 20 000 units = 58,5 mg) etwa 1,5 mg Protein pro ml Testansatz

Gesamtvolumen: 0,4 - 0,5 ml
Da 1 Mol UDPGa 2 Mol NADH entspricht, muß zur Berechnung der Aktivität der gemessene NADH-Umsatz durch 2 dividiert werden.
Messungen im November

Oxydoreductasen

Alle Messungen erfolgten Ende April bis Anfang Mai.
Das Gesamtvolumen betrug stets 1 ml.

Sorbitdehydrogenase (SDH, EC: 1.1.1.14, L-Idit: NAD-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach GERLACH (1962). Sie beruht auf folgender Reaktion:
D-Fructose + NADH = D-Sorbit + NAD^+

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) 100; NADH 0,4; D-Fructose (Fluka, Buchs, Schweiz) 600

Mannit-1-phosphat-dehydrogenase (EC: 1.1.1.17, D-Mannit-1-phosphat: NAD-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach LISS et al. (1962). Sie beruht auf folgender Reaktion:
F-6-P + NADH = M-1-P + NAD^+

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) 100; NADH 0,2 - 1,5; F-6-P 2 - 60

Aldosereductase (EC: 1.1.1.21, Aldit: NADP-oxydoreductase)

Die Bestimmung erfolgte nach HERS (1960). Sie beruht auf folgender Reaktion:
D-Aldose + NADPH = D-Aldit + $NADP^+$

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) 110; NADPH 0,25; D-Glucose (Fluka, Buchs, Schweiz) 450

UDPG-dehydrogenase (EC: 1.1.1.22, UDP-glucose: NAD-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach STROMINGER et al. (1957). Sie beruht auf folgender Reaktion:
UDPG + $2NAD^+$ + H_2O = UDP-glucuronat + 2 NADH

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 8,7) 150; NAD^+ 0,3 - 2,5; UDPG 0,5 - 10

Glucosedehydrogenase (EC: 1.1.1.47, ß-D-Glucose: NAD(P)-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach STRECKER und KORKES (1952). Sie beruht auf folgender Reaktion:
ß-D-Glucose + $NAD(P)^+$ = D-Gluconolacton + NAD(P)H

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) 100; $NAD(P)^+$ 0,15 - 1,7; Glucose (Fluka, Buchs, Schweiz) 15 - 750

Sorbit-6-phosphat-dehydrogenase (EC: 1.1.1.c, D-Sorbit-6-phosphat: NAD-oxydoreductase)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach LISS et al. (1962). Sie beruht auf folgender Reaktion:
S-6-P + NAD^+ = F-6-P + NADH

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) 100; NAD^+ 0,2 - 1,5; S-6-P 2 - 45

Aldolasen

1-Phosphofructaldolase (1PFA, EC: 4.1.2.7, Ketose-1-phosphat Aldehyd-lyase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach MATTENHEIMER (1966). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:
F-1-P = DHAP + Glycerinaldehyd
DHAP + NADH = Gly-1-P + NAD^+ (GDH)

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 40; F-1-P 30; NADH 0,6; GDH (2mg/ml) 2 µl

Gesamtvolumen: 0,25 ml
Messungen im Januar und April

Ein Substratoptimum konnte nicht erreicht werden, was mit den Befunden anderer Autoren übereinstimmt (zusammenfassend LEUTHARDT 1966); allein zwischen einer Substratkonzentration von 45 - 195 mM stieg die Aktivität um etwa 260% an.

Fructosediphosphataldolase (EC: 4.1.2.13, Fructose-1,6-diphosphat D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-lyase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde von KELLER (1964) übernommen. Sie beruht auf folgenden Reaktionen:
FDP = DHAP + GAP
GAP = DHAP (TIM)
2DHAP + 2NADH = 2Gly-1-P + $2NAD^+$ (GDH)

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 45; NADH 0,35; FDP 3; TIM/GDH (2 mg/ml) 10 µl
Monojodacetat war ohne Einfluß auf die Umsatzrate und wurde daher weggelassen.
Gesamtvolumen: 1 ml
Messungen im Januar
Zur Berechnung der Aktivität wurde der gemessene NADH-Umsatz durch 2 dividiert.

Phosphoglucosamin-isomerase (PGI, EC: 5.3.1.10, 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-6-phosphat Ketol-isomerase)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach LELOIR und CARDINI (1962), kombiniert mit NAKALA (1966). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:
Gm-6-P + H_2O = F-6-P + NH_3
F-6-P = G-6-P (Phosphoglucose-isomerase)
G-6-P + $NADP^+$ = 6-PGL + NADPH (G6PDH)

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 8,6) 30; $NADP^+$ 0,35; A-Gm-6-P etwa 6; Gm-6-P (Sigma, St. Louis, USA) 11; Phosphoglucose-isomerase (2 mg/ml) 5 µl; G6PDH (5 mg/ml) 5 µl; Homogenat (5000 g-Überstand)

A-Gm-6-P wurde nach einer Vorschrift von DISTLER et al. (1958) aus Gm-6-P und Essigsäureanhydrid hergestellt.
Gesamtvolumen: 0,5 ml
Messungen im Sommer (Juli, August) und Herbst (Oktober)
Die Aktivitäten, die sich durch Verunreinigungen der käuflichen G6PDH mit PGI ergaben, wurden in einer Kontrollküvette bestimmt und von der Gesamtaktivität abgezogen.

7 Systematische Fehler

Die Bemerkungen von KELLER (1964) über den Einfluß des Häutungsstadiums, des Ernährungszustandes, des Alters und der Jahreszeit auf das Stoffwechselgeschehen der Crustaceen gilt auch für diese Arbeit. Meine Aufgabe bestand nicht darin, den jahreszeitlichen Gang der Enzymaktivitäten festzustellen; es sollte nur qualitativ untersucht werden, ob die vom allgemeinen Stoffwechselschema her bekannten Enzyme auch bei einem Vertreter der decapoden Crustaceen vorkommen. Daß sich hochsignifikante Unterschiede der Aktivitäten im Verlaufe des Jahres ergeben können, wurde mehrmals nachgewiesen.

Entsprechend den Forderungen von PETTE (1968) wurde eine Standardisierung sowohl der Enzymextraktion als auch der Aktivitätsbestimmung angestrebt, da diese erst jene Voraussetzungen schafft, die eine Interpretation des Enzymaktivitätsmusters durch vergleichende Analyse rechtfertigen. Auf die Fragwürdigkeit der in vitro in Rohhomogenaten gemessenen Aktivitäten wurde schon in der Einleitung hingewiesen.

Ein Problem, das bei der Messung von Organverteilungsmustern von Enzymen des Flußkrebses immer wieder auftritt, ist die Tatsache, daß sich Enzymaktivitäten im Rohhomogenat der Mitteldarmdrüse wegen der hohen Aktivitäten an Proteasen nicht exakt bestimmen lassen (KELLER 1964, URICH 1967, GRASZYNSKI 1970). Demzufolge werden viele Enzymaktivitäten in der Mitteldarmdrüse zu niedrig gefunden oder sind nicht nachweisbar. Es wurde zum Teil versucht, diesen Effekt durch Zugabe von Eialbumin zum Homogenat bzw. durch kontinuierliches Aufwirbeln ("Plümpern") der Gewebesuspension zu verhindern (s. PETTE 1968, GRASZYNSKI 1970).

8 Anzahl der Messungen - Statistik

Bei den Aktivitätsmessungen der Enzyme wurden mindestens drei, meist vier bis fünf unabhängige Bestimmungen an derselben Zahl von Versuchstieren ausgeführt. In Fällen, in denen es - bei kleinen Organen und geringen Enzymaktivitäten - notwendig war, mehrere Tiere zu einer Bestimmung zusammenzulegen, wurde die Bestimmung normalerweise an drei voneinander unabhängigen Gruppen von Tieren vorgenommen.

Angegeben und tabelliert wurden die Mittelwerte der Messungen:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x_i}{n}$$

und die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert (= Standardabweichung):

$$s = \pm\sqrt{\frac{\Sigma(x_i-\bar{x})^2}{n-1}}$$

Zum statistischen Vergleich zweier Messreihen wurde das t-Verfahren angewandt (BELITZ 1960). Die zugehörigen P-Werte wurden aus den graphischen Tafeln von PATAU, veröffentlicht in BELITZ (1960), entnommen.

Ergebnisse

1 Enzyme des Pentosephosphat-cyclus

In Tabelle 1 sind die Aktivitäten [mU/mg Protein] der Enzyme Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH), 6-Phosphogluconat-dehydrogenase (6PGDH), Transaldolase (TA) und Transketolase (TK) aufgeführt. Die Novemberwerte für die G6PDH und 6PGDH wurden an dem selben Homogenat ermittelt.

Obwohl Enzymaktivitäten einzelner Reaktionsketten verschiedener Gewebe um Größenordnungen voneinander abweichen können, so stehen sie oft innerhalb einer Reaktionskette zueinander im gleichen konstanten Verhältnis ("Proportionskonstanz", s. PETTE 1965, 1968). Eine derartige Proportionskonstanz für Enzyme der Glykolyse, des Citratcyclus, der Atmungskette und des Fettsäureabbaus ist bereits in einer ganzen Reihe von Säuger- und Insektenorganen (s. PETTE) gefunden worden. KELLER (1964) konnte beim Flußkrebs eine "proportionskonstante Enzymgruppe" innerhalb des Citronensäure-cyclus und JANTZEN (1967) innerhalb des Glykogenstoffwechsels finden. Für den Pentosephosphat-cyclus wurde meines Wissens noch keine Proportionskonstanz gefunden; so überrascht es nicht, daß sich auch beim Flußkrebs keine umfassende Proportionskonstanz entdecken läßt. Obwohl die beiden den Pentosephosphat-cyclus einleitenden Dehydrogenasen in einer Reaktionsfolge ohne Verzweigungsstellen stehen, lassen sie keine Proportionskonstanz erkennen; nur die Transferasen stehen zueinander in konstanten Aktivitätsverhältnissen (Tab.1). Die Schwankungen bewegen sich im Rahmen der auch von PETTE (1965) und KELLER (1964) beobachteten. Wie bei den Enzymen des Citratcyclus und des Fettsäureabbaus (s. GRASZYNSKI 1968 b) fällt der Wert für die Kiemen etwas heraus.

Trotz weiter Verbreitung im Tier- und Pflanzenreich wurde der Pentosephosphat-cyclus erst spät bei den Crustaceen untersucht. So gelang HOCHACHKA et al. (1962) der Nachweis des Pentosephosphat-cyclus durch Veratmung seiner Intermediärprodukte unter Verwendung der Hummermitteldarmdrüse. Aus Experimenten

	G6PDH (Nov.)	6PGDH (Feb./März)	6PGDH (Juni)	6PGDH (Nov.)	TA	TK	$\frac{TA}{TK}$	$\frac{G6PDH}{6PGDH}$
Antennendrüse	254 ± 45,4	196 ± 88,7	77,4 ± 3,1	153 ± 21,5	30,6 ± 2,2	25,1 ± 3,5	1,2	1,7
Kiemen	210 ± 14,2	56,9 ± 19,2	23,8 ± 1,9	35,0 ± 4,0	29,7 ± 3,5	11,2 ± 2,0	2,6	6,0
Enddarm	186 ± 15,5	86,0 ± 19,8	39,4 ± 3,9	58,4 ± 13,9	43,7 ± 4,0	31,0 ± 2,1	1,4	3,2
Hoden	137 ± 12,9	25,2 ± 6,2	17,3 ± 0,6	19,9 ± 0,5	21,5 ± 2,3	13,2 ± 0,7	1,6	6,9
Integument-gewebe	62,5 ± 6,1	29,7 ± 3,6	17,7 ± 1,1	13,4 ± 2,0	22,3 ± 3,9	12,3 ± 2,3	1,8	4,7
Herz	6,8 ± 1,7	16,8 ± 5,1	10,1 ± 1,5	12,7 ± 1,5	—	0	—	0,5
Bauchmark	—	35,4 ± 6,9	18,7 ± 1,2	—	47,3 ± 6,0	53,7 ± 8,6	0,9	—
Magen	—	26,7 ± 10,6	—	—	—	—	—	—
Schwanzmuskel	—	2,6 ± 0,4	—	—	—	—	—	—
Mitteldarm-drüse	—	0	—	—	—	0,8 ± 0,8	—	—
Blutserum	—	0,3 ± 0,1	—	—	—	—	—	—

Tab. 1 Aktivitäten [mU/mg Protein] der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH), 6-Phosphogluconat-dehydrogenase (6PGDH), Transaldolase (TA) und Transketolase (TK) in verschiedenen Organen des Flußkrebses.

mit 5-Bromuracil, einem Hemmstoff der G6PDH, und direkten Enzymmessungen an der Mitteldarmdrüse von Orconectes virilis schlossen McWHINNIE und CORKILL (1964), daß der Pentosephosphat-cyclus vor allem bei Zwischenhäutungstieren aktiv, in der späten Vorhäutungsphase praktisch inaktiv ist. Diese Veränderungen werden offenbar durch ein Augenstielhormon gesteuert (McWHINNIE und CHUA 1964). Radiorespirometrischen Messungen und Veratmungsversuchen entnahmen FUYEAR et al. (1965), daß der Glucoseabbau außer über die Glykolyse und den Glucuronatweg auch über den Pentosephosphat-cyclus erfolgt. HARTENSTEIN (1964) konnte bei dem Isopoden Oniscus asellus die beiden Dehydrogenasen in Mitteldarmdrüse und Verdauungstrakt nicht finden, gibt aber für den Restkörper sehr schwache Aktivitäten an.

Die Befunde von McWHINNIE und CORKILL (1964) werden durch Tabelle 2 bestätigt und erweitert. Ein Vergleich der zu den verschiedenen Jahreszeiten gemessenen 6PGDH-Werte zeigt, daß die Zwischenhäutungstiere im Frühjahr in fast allen untersuchten Organen eine signifikant höhere Aktivität besitzen als die Zwischenhäutungstiere im Sommer. Im Herbst steigen die Aktivitäten dann wieder auf Werte an, die zwischen den Minimalwerten des Sommers und den Maximalwerten des Frühjahrs liegen.

	Feb. März	Juni	Nov.	Statistische Signifikanz P: Feb. März ⟶ Juni	Juni ⟶ Nov.	Nov. ⟶ Feb. März
Antennendrüse	100	40	78	<0,05	<0,0027	>0,05
Enddarm	100	46	68	<0,01	>0,05	>0,05
Kiemen	100	42	62	<0,05	<0,01	>0,05
Integumentgewebe	100	60	45	<0,01	<0,05	<0,01
Hoden	100	69	79	<0,05	<0,01	>0,05
Herz	100	60	75	>0,05	>0,05	>0,05

Tab. 2 Jahreszeitliche Veränderungen der Aktivität der 6-Phosphogluconat-dehydrogenase. Angaben in % des am gleichen Organ im Febr./März bestimmten Wertes.

Interessant ist es, daß sich die Aktivitäten in allen Organen gleichsinnig um etwa den selben Wert verändern. Die einzige Ausnahme macht das Integumentgewebe. Seine Aktivität liegt im Juni etwas höher als im November. Dieser Befund läßt sich aber mit dem besonders hohen Stoffwechsel dieses Organs im Zuge der Häutungsvorbereitung erklären. Die hohen Standardabweichungen der Frühjahrswerte beruhen wohl auf den unterschiedlichen physiologischen Zuständen der Versuchstiere während der relativ langen Meßperiode (Febr./März), da in diese Zeit tiefgreifende Veränderungen des Stoffwechsels fallen. (zusammenfassend URICH 1968).

Ein Vergleich der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Aktivitätswerte mit den Ergebnissen anderer Autoren muß sich auf die Säugetiere beschränken, da für Crustaceen nur sehr wenige Ergebnisse vorliegen. Bei der Ratte konnten NOVELLO und McLEAN (1968) an sechs verschiedenen Organen für die Enzyme des Pentosephosphat-cyclus keine Proportionskonstanz finden. Die spezifischen Enzymaktivitäten in den Organen des Flußkrebses sind etwa so hoch wie die in den Organen der Ratte. Nach TAN und WOOD (1969) sind die Aktivitäten der vier nicht-oxydativen Pentosephosphat-cyclus-Enzyme im Ratten- und Hummermuskel niedrig gegenüber denen der Glykolyse; eine Ausnahme macht die Ribose-5-phosphat-isomerase, deren Aktivität im Hummermuskel (266 mU/mg Protein; 3500 g-Homogenatüberstand, 37°C) die des Rattenmuskels um das achtfache übertrifft. Im allgemeinen ergibt sich die Reihenfolge: Ribose-5-P-isomerase > Ribulose-5-P-3-epimerase > Transketolase > Transaldolase. McWHINNIE und CORKILL (1964) fanden bei Vollhomogenaten der Orconectes-Mitteldarmdrüse eine Aktivität der G6PDH von 10 bzw. 5 mU/mg Protein für Zwischenhäutungs- bzw. Vorhäutungstiere. Die entsprechenden Werte für die 6PGDH lagen bei 0,4 bzw. 0 mU/mg Protein. KELLER (1964) erhielt bei Orconectes in Hoden und Antennendrüse die höchsten Aktivitäten(gemessen im Juni)für die G6PDH.

Eine Bestimmung der G6PDH erfolgte Ende April in der Antennendrüse mit G-6-P oder F-6-P als Substrat und NAD^+ oder $NADP^+$

als Cosubstrat. Gegenüber dem angegebenen Testansatz wurde Glycylglycin-Puffer durch Tris-Puffer ersetzt. G-6-P oder F-6-P mit $NADP^+$ ergaben identische Werte von etwa 120 ± 20 mU/mg Protein. NAD^+ war dagegen mit beiden Substraten inaktiv. Es lag nahe, die Aktivität des F-6-P auf die in der Antennendrüse sehr aktive Hexose-P-isomerase zurückzuführen; nach JANTZEN (1967) beträgt sie etwa 1400 mU/mg Protein. Diese Vermutung wurde bestärkt durch Hemmung der Isomerase mit Mg^{2+}-Ionen. Bei einer $MgCl_2$-Konzentration von 20 mM/l war die Aktivität mit G-6-P oder F-6-P noch gleich hoch - mit steigenden Mg^{2+}-Konzentrationen sank die Aktivität mit F-6-P gegenüber der mit G-6-P.

2 Enzyme des Galactosestoffwechsels (Leloir-Weg)

In der Tabelle 3 sind die Aktivitäten der Enzyme des Galactosestoffwechsels, die Hexose-1-phosphat-uridyltransferase (Uridyltransf.) und UDP-glucose-4-epimerase (UDPGEP) und zusätzlich die Aktivität der von JANTZEN (1967) untersuchten Glykogensynthetase (Synthetase I + D) aufgeführt. In vielen Fällen konnte keine Uridyltransf.-Aktivität nachgewiesen werden; es werden daher in der Tabelle Minimal- und Maximalwerte angegeben.

	Hexose-1-P-uridyltransf.	UDPG-epimerase	Glykogensynthetase [1)]
Integumentgewebe	0,4 - 0,6	3,1 ± 1,1	—
Mitteldarmdrüse	0 - 0,6	0,3 ± 0,1	—
Kiemen	0,4 - 0,6	0,7 ± 0,2	0,8
Hoden	0 - 0,3	1,3 ± 0,4	—
Schwanzmuskel	0 - 0,2	0	53,3
Antennendrüse	0 - 0,1	3,7 ± 0,5	10,2
Enddarm	0	7,8 ± 1,7	18,2

Tab. 3 Aktivitäten [mU/mg Protein] der Hexose-1-phosphat-uridyltransferase, UDP-glucose-4-epimerase und Glykogensynthetase in verschiedenen Organen des Flußkrebses.
Literatur: 1) JANTZEN (1967)

Es besteht offenbar keine Korrelation zwischen den beiden Enzymen des Leloir-Weges. Während im Enddarm die Aktivität der Epimerase am größten ist, konnte eine Transferase nicht nachgewiesen werden. Der relativ hohen Aktivität der Epimerase in der Antennendrüse steht eine um zumindest den Faktor 40 kleinere Aktivität der Transferase gegenüber; im Integumentgewebe und Hoden beträgt dieser Faktor zumindest 5. Als konkurrierendes Enzym um das Substrat UDPG ist die Glykogensynthetase besonders im Schwanzmuskel, einem Organ mit ausgeprägtem glykolytischem Enzymmuster (KELLER 1964), mit sehr hohen Aktivitäten vertreten, während die UDPG-Epimerase nicht nachgewiesen werden konnte und die Transferase nur sehr schwache Aktivitäten zeigt. In Antennendrüse und Enddarm liegen die Synthetaseaktivitäten rund 2,5mal höher als die der Epimerase, wobei auch hier eine Transferaseaktivität kaum nachweisbar ist. Die Kiemen, als ein Organ mit überwiegend oxydativem Kohlenhydratabbau, zeigen dagegen für alle drei Enzyme relativ schwache Aktivitäten der selben Größenordnung. Die Aktivitäten der Enzyme des Galactosestoffwechsels scheinen bei Säugetieren höher zu liegen, besonders in dem Zentralorgan des Stoffwechsels, der Leber (MAXWELL et al. 1962). Für Crustaceen liegen meines Wissens keine Vergleichsdaten vor.

Die UDPG-epimerase katalysiert die Endreaktion des Hauptweges des Galactosestoffwechsels, wie er in vielen Organismen besteht (KALCKAR 1958, MAXWELL 1961).

Galactose + ATP = Ga-1-P + ADP	Galactokinase
Ga-1-P + UDPG = UDPGa + G-1-P	Uridyltransf.
UDPGa = UDPG	UDPGEP
Galactose + ATP = G-1-P + ADP	

Nicht nur für das Einschleusen von Galactose in den Hexosephosphatstoffwechsel spielt die UDPGEP eine wichtige Rolle sondern auch für Synthesen, die von Glucose ausgehen und bei denen Galactose benötigt wird. So konnte SPECK (1967) beim Flußkrebs Galactose und Galactosamin als Polysaccharidbausteine nachweisen; Galactose fand sich auch in freier Form. Über die Bedeutung von Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und Galactolipiden liegen für die Crustaceen erst wenige Untersuchungen vor.

.3 Oxydoreductasen

Die Untersuchungen der Oxydoreductasen wurden auf die Antennendrüse beschränkt, da Vorversuche ergeben haben, daß dieses Organ i.a. die höchste Aktivität aufweist; nur wenn keine Aktivität gemessen werden konnte, wurde auch die Mitteldarmdrüse untersucht.

Bei der Bestimmung der Sorbitdehydrogenase (SDH) ergab sich eine spezifische Aktivität von 45,5 ± 9,0 mU/mg Protein. Interessanterweise konnte auch bei Verwendung von NADPH anstelle des üblichen Cosubstrats NADH eine, wenn auch vergleichsweise schwache, Aktivität von 2,7 ± 0,7 mU/mg Protein gefunden werden; dies ist umso merkwürdiger, als gereinigte SDH unterschiedlicher Herkunft mit diesem Cosubstrat völlig wirkungslos ist (zusammenfassend HOLLMANN 1964, DESAI et al. 1969). Im Oktober wurden in Vorversuchen SDH-Aktivitäten in der Antennendrüse, der Mitteldarmdrüse und dem Ovar gefunden. Dies entspricht etwa den Befunden von KAILUWEIT (1964, unveröffentlicht), der für Antennendrüse und Mitteldarmdrüse eine Aktivität von 15 bzw. 3 mU/mg Protein angibt. Für acht andere Organe beschreibt er keine oder nur sehr schwache Aktivitäten. Nach HÄSTEIN und VELLE (1969) liegen die Aktivitäten der SDH in der Schafsplazenta und -Samenblase in der selben Größenordnung wie in der Krebsantennendrüse.

Bei der Messung der Aldosereductase mit D-Glucose, D-Galactose oder D-Mannose ergaben sich folgende Aktivitäten: 2,3 ± 0,6, 1,9 ± 0,4, 0,35 ± 0,05. Auch mit Acetontrockenpulver-Extrakten lagen die Aktivitäten in der selben Größenordnung. Alle drei Substrate waren dagegen inaktiv mit NADH als Cosubstrat, auch bei Verwendung von Acetontrockenpulver. Bei der Aldosereductase von Kälberlinsen konnten HAYMAN und KINOSHITA (1965) feststellen, daß der Umsatz mit NADH 10 - 15% des Umsatzes mit NADPH beträgt.

Nach der Glucosedehydrogenase wurde im Frühjahr und Herbst in den Organen Antennendrüse und Mitteldarmdrüse gesucht und mit Glucose, Galactose oder Mannose als Substrat und NAD^+ oder $NADP^+$ als Cosubstrat keine Aktivität gefunden. Da nach METZGER et al. (1965) die Glucosedehydrogenase bei Wirbeltieren in der

"schweren Mikrosomenfraktion" lokalisiert ist, wurde versucht, durch Acetonbehandlung das Enzym freizusetzen; dies führte aber auch zu keinem Erfolg. SCHIWARA und Mitarb. (1968 a,b) nehmen an, daß das Enzym in der Säugetierleber auch im cytoplasmatischen Bereich lokalisiert sein muß, ohne aber diese Frage weiter zu diskutieren. Die Aktivitäten sind in den bis jetzt untersuchten Tieren sehr niedrig; so geben METZGER et al. (1965) für ein Rinderleber-Rohhomogenat eine Aktivität von 1 mU/mg Protein an. Eine Galactosedehydrogenase (EC: 1.1.1.48, D-Galactose + NAD^+ = D-Galactonolacton + NADH) wurde außer bei Mikroorganismen auch in tierischen Geweben gefunden (CUATRECASAS und SEGAL 1966). Ihre Aktivität ist im Leberrohhomogenat der Ratte rund siebenmal größer als die der Glucosedehydrogenase; dabei finden sich 85 % der Aktivität in der löslichen Zellfraktion. Die Säugetier-Galactosedehydrogenase ist spezifisch für NAD^+, während Glucosedehydrogenase NAD^+ und $NADP^+$ umzusetzen vermag.

Eine Aktivität der bakteriellen Polyol-dehydrogenasen konnte nicht gefunden werden. Die Messung der Mannit-1-phosphat-dehydrogenase mit F-6-P oder G-6-P als Substraten sowie NADH oder NADPH als Cosubstraten führten zu keinem Erfolg. Auch bei der Bestimmung der Sorbit-6-phosphat-dehydrogenase konnte mit S-6-P und NAD^+ oder $NADP^+$ keine Aktivität festgestellt werden. Beide Enzyme wurden bisher nur bei Bakterien gefunden. Sie sind hochspezifisch für ihre Substrate.

Nach der UDP-glucose-dehydrogenase (UDPGDH) wurde im Frühjahr und Herbst in der Antennen- und Mitteldarmdrüse vergeblich gesucht; auch Acetontrockenpulver und $MgCl_2$-Zusatz zum Homogenat erbrachten keine Aktivität. PUYEAR (1967) konnte die UDPGDH als das den Glucuronsäure-Stoffwechsel einleitende Enzym bei der Krabbe Callinectes sapidus mit dem angegebenen optischen Test bestimmen. Er gibt für den 7200 g-Überstand der Mitteldarmdrüse eine Aktivität von 0,26 µM UDPG/0,1 g Frischgewicht·h an, allerdings ohne nähere Angaben über das Versuchstier in Bezug auf Geschlecht und Häutungsstadium oder die Jahreszeit. Nach URICH (1967) entspricht bei Orconectes einem Gramm Frischgewicht in der Mitteldarmdrüse etwa 60 mg Protein des bei

15 000 g zentrifugierten Homogenatüberstands. Nach dieser Umrechnung ergibt sich die UDPGDH-Aktivität zu etwa 0,5 mU/mg Protein. WILSON (1965) fand für die Kalbsleber nach dem ersten Reinigungsschritt eine Aktivität in ungefähr der gleichen Größenordnung.

4 Aldolasen

In Tabelle 4 sind die Aktivitäten der beiden Aldolasen, der Fructosediphosphataldolase und der 1-Phosphofructaldolase (1PFA) aufgeführt. Die Januarwerte wurden an dem selben Homogenat erhalten. Zusätzlich wurde das FDP/F-1-P-Aktivitätsverhältnis der Januarwerte angegeben.

	Aldolase (Jan.)	1-Phosphofructaldolase (Jan.)		(Apr.)	FDP / F-1-P
Schwanzmuskel	758 ± 101	32,1 ± 2,5	**	106,4 ± 8,0	24
Herz	701 ± 11,3	35,9 ± 3,9		33,7 ± 4,9	20
Bauchmark	344 ± 43,3	15,6 ± 1,9		21,3 ± 7,1	22
Antennendrüse	232 ± 29,8	18,7 ± 0,2		15,3 ± 3,8	12
Enddarm	186 ± 9,4	16,6 ± 1,5	*	8,1 ± 0,9	11
Kiemen	35 ± 1,0	4,0 ± 0,2		———	9
Hoden	30 ± 4,6	3,9 ± 0,5	*	2,2 ± 0,3	8
Integumentgewebe	26 ± 3,1	6,1 ± 1,2		———	4

Tab. 4 Aktivitäten [mU/mg Protein] der Fructosediphosphataldolase und der 1-Phosphofructaldolase in verschiedenen Organen des Flußkrebses

** bedeutet: $P < 0{,}0027$ (hochsignifikant)
* " : $0{,}05 > P > 0{,}0027$ (signifikant)

Wie bei der 6PGDH und zahlreichen anderen Enzymen lassen sich auch bei der 1PFA bei der Hälfte der untersuchten Organe signifikante Unterschiede der Aktivität zu verschiedenen Jahreszeiten feststellen.

Nach dem FDP/F-1-P-Aktivitätsverhältnis scheinen bei dem Flußkrebs wie bei den bisher untersuchten Wirbeltieren zwei oder mehrere Aldolasevarianten vorzukommen; auch daß die Gesamtaktivität bei Zugabe beider Substrate dieselbe Größe erreicht wie die Summe der Einzelaktivitäten, spricht für diese Vermutung.

Eine Zusammenfassung über Aldolasen findet man bei LEBHERZ und RUTTER (1969).[1] Danach gibt es bei den Vertebraten multiple Formen der Klasse I-Aldolasen. Vom Kaninchen wurden drei Varianten isoliert: Aldolase A, das klassische Muskelenzym; Aldolase B aus der Leber und Aldolase C aus dem Gehirn. Diese Aldolasen scheinen homologe Proteine zu sein. LEBHERZ und RUTTER konnten bei der Forelle und dem Lachs noch eine vierte Aldolaseform nachweisen. Die Aldolasen A, B und C sind bei den Wirbeltieren auf bestimmte Gewebe verteilt. Aldolase A wurde in den meisten untersuchten Geweben gefunden; Aldolase B nur in Leber und Niere; Aldolase C im Gehirn und zuweilen in Herz, Milz und anderen Geweben. Eines der Hauptkriterien zur Bestimmung verschiedener Aldolasevarianten ist die Substratspezifität, ausgedrückt durch das FDP/F-1-P-Aktivitätsverhältnis. Die FDP/F-1-P-Aktivitätsverhältnisse der Kaninchenaldolasen A, B und C sind annähernd 50, 1 und 12 (RUTTER et al. 1968)[2]. Bei den Untersuchungen an Pacifastacus trobridgii und Homarus americanus erhielten LEBHERZ und RUTTER durch Cellulose-polyacetat-Elektrophorese der verschiedenen Gewebe keine unterschiedlichen Elektropherogramme, die FDP/F-1-P-Aktivitätsverhältnisse ergaben jedoch unterschiedliche Werte; so zeigte bei Pacifastacus der Schwanzmuskel einen hohen Quotienten von etwa 29 und die Mitteldarmdrüse einen niedrigen von etwa 2,8. Ausgehend von den Beobachtungen DRECHSLER'S et al. (1959)[2], daß geringe Carboxy-

---

1 Hier auch weitere Literaturangaben

2 Zit. nach LEBHERZ und RUTTER (1969)

peptidase-Aktivitäten das FDP/F-1-P-Verhältnis der Kaninchenaldolase A von ungefähr 50 auf 1 sinken lassen, wiesen LEBHERZ und RUTTER nach, daß die proteolytischen Enzyme der Mitteldarmdrüse Ähnliches bewirken. Anhand dieser Befunde und detaillierter Untersuchungen weiterer Kriterien zur Identifikation von Aldolasen schließen LEBHERZ und RUTTER, daß die Unterschiede in den FDP/F-1-P-Verhältnissen bei den untersuchten Invertebraten-Geweben auf proteolytische Modifikationen zurückzuführen sind und nicht auf gewebsspezifische Aldolasevarianten wie bei den Wirbeltieren. Sie halten aber die Diskussion noch nicht für abgeschlossen und empfehlen weitere Untersuchungen, besonders, da sie im Krabbenmuskel multiple Aldolaseformen festgestellt haben.

5 Phosphoglucosamin-isomerase

Die Bestimmung der Phosphoglucosamin-isomerase (PGI) erfolgte mit N-Acetylglucosamin-6-P (A-Gm-6-P) als Aktivator. Während A-Gm-6-P bei Bakterien keine aktivierende Wirkung auf die PGI zeigt (COMB und ROSEMAN 1958, NAKADA 1966), wirkt es als starker Aktivator beim Enzym der Schweineniere (COMB und ROSEMAN 1958, LELOIR und CARDINI 1962). Beim Flußkrebsenzym wirkt A-Gm-6-P stark aktivierend, unabhängig davon, daß es im Rohextrakt durch die Aktivität der N-Acetylglucosamin-6-P-acetylase in Gm-6-P umgewandelt wird und dadurch als Substrat für die PGI zur Verfügung steht. Das Enzym der Schweineniere ergab bei einem Testansatz ähnlich dem hier benutzten eine spezifische Aktivität von 38 mU/mg Protein (LELOIR und CARDINI 1962). Dabei erfolgte die Messung an einem dialysierten 21 000g-Überstand, unter Zusatz von A-Gm-6-P als Aktivator und bei einer Temperatur von 37°C. Die Reaktion war reversibel. Die Michaeliskonstante für das Substrat Gm-6-P bei Gegenwart von A-Gm-6-P betrug $6{,}6 \cdot 10^{-4}$ M und stieg bei Abwesenheit des Aktivators auf $1{,}4 \cdot 10^{-2}$ M an.

Tabelle 5 zeigt die Aktivität der PGI in verschiedenen Organen des Flußkrebses, bei frischgehäuteten Tieren (3 h nach der Häutung) im Sommer sowie bei Zwischenhäutungstieren im Oktober.

	frischgehäut. Tiere (Juli/Aug.)		Zwischenhäut.-Tiere (Oktober)
Enddarm	40,3 ± 3,6	**	18,1 ± 2,1
Antennen-drüse	34,6 ± 15,9		13,6 ± 1,0
Kiemen	25,1 ± 1,1	**	4,3 ± 0,1
Bauch-mark	23,0 ± 8,3		11,7 ± 2,4
Ovar	22,3 ± 8,0	*	1,2 ± 0,1
Integument-gewebe	21,8 ± 6,2	**	6,2 ± 0,9
Herz	16,6 ± 2,3		15,8 ± 1,3
Mitteldarm-drüse	10,9 ± 4,3	*	0,6 ± 0,3
Hoden	10,3 ± 5,3		5,4 ± 0,5
Schwanz-muskel	2,2 ± 0,7	*	0,7 ± 0,1
Hämolymphe	0,7 ± 0,4		—

Tab. 5 Die Aktivität der Phosphoglucosamin-isomerase bei frischgehäuteten Tieren und Zwischenhäutungstieren in verschiedenen Organen.

** bedeutet: $P < 0{,}0027$ (hochsignifikant)

* " : $0{,}05 > P > 0{,}0027$ (signifikant)

Bei der Mehrzahl der Organe ist die Aktivität der PGI bei den Zwischenhäutungstieren signifikant kleiner als bei den frischgehäuteten Tieren. Die hochsignifikanten Aktivitätsunterschiede der am Aufbau der Kutikula beteiligten Organe, Integumentgewebe, Kiemen und Enddarm weisen offensichtlich auf den Zusammenhang mit der Chitinsynthese hin. Eine Erklärung der relativ hohen Aktivitäten in den nicht am Aufbau der Kutikula beteiligten Organen könnte vielleicht die Tatsache sein, daß Glucosamin in gebundener Form nicht nur im Chitin vorkommt, sondern auch in anderen Polysacchariden (SPECK 1967), Glykoproteinen und Glykolipiden. Chitin stellt auch einen wesentlichen Bestandteil der peritrophischen Membran bei Insekten und Krebsen dar (s. GEORGI 1969).

Diskussion

1 Literaturübersicht

Erst zu Beginn der sechziger Jahre kann von einer systematischen Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels der Crustaceen gesprochen werden, wobei fast ausschließlich decapode Crustaceen als Versuchsobjekt dienten. So legten die Untersuchungen von SCHEER und SCHEER (1951), SCHWABE et al. (1952) sowie KERMACK und Mitarb. (1954) noch die Vermutung nahe, daß die Kohlenhydrate im energieliefernden Stoffwechsel der Crustaceen nur eine unwichtige Rolle spielen und ihr Stoffwechsel somit von dem der Wirbeltiere abweichend organisiert ist, da nach Injektion von ^{14}C-Glucose im ausgeatmeten CO_2 keine Aktivität nachzuweisen war, bzw. im Warburg-Versuch die Sauerstoffaufnahme durch Intermediärprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels nicht zu steigern war. Der Befund von NEILAND und SCHEER (1953), daß beim Hungern nur Protein, nicht aber Glykogen abgebaut wird, unterstützte diese Vermutungen, und veranlaßte SCHEER (1957) zu der Annahme, daß Glykogen nicht wie bei den Wirbeltieren eine Energiequelle darstelle, sondern nur als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese diene. Schon 1949 hatte RENAUD die Anhäufung von Glykogen in der Mitteldarmdrüse und Hypodermis vor der Häutung und die Abnahme nach der Häutung bei Cancer pagurus festgestellt.

Erst die Befunde von HU(1958), MEENAKSHI und SCHEER (1961), BERGREEN und Mitarb. (1961), HOCHACHKA et al. (1962), MUNDAY und THOMPSON (1962), BEECHEY et al. (1963) und KELLER (1964) zeigten dann die Existenz eines funktionierenden Glykolyse-Citratcyclus-Systems. Diese und neuere Arbeiten haben nun bewiesen, daß das allgemeine Stoffwechselschema auch für die Crustaceen gilt: Glykolyse und Pentosephosphat-cyclus, Citratcyclus und oxydative Phosphorylierung wurden durch eine Vielzahl von Befunden auch bei den Crustaceen nachgewiesen. Nach PUYEAR et al. (1965) kann der Glucoseabbau offenbar auf drei Wegen erfolgen: Glykolyse und Citratcyclus, Pentosephosphat-cyclus und Glucuronatweg. Die Enzyme des Glucuronsäurestoffwechsels (PUYEAR 1967) und der Glykogenese und Glykogenolyse (JANTZEN 1967) wurden näher charakterisiert. McWHINNIE und CORKILL (1964)

und McWHINNIE und CHUA (1964) stellten Veränderungen in der Bedeutung des Pentosephosphat-cyclus und des glykolytischen Abbaus im Zusammenhang mit der Häutung fest. An isolierten Mitteldarmdrüsen - Mitochondrien gelang BURRIN und BEECHEY (1964, 1966) der Nachweis der Enzyme der Atmungskette. Nach Versuchen mit ^{14}C-markierten Metaboliten schloss DALL (1965 b), daß bei der Garnele Metapenaeus nicht Glykogen, sondern ein saures Mucopolysaccharid als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese dient. Durch weitere Tracer-Versuche konnten DALL, ZANDEE (1966), HUGGINS (1966) sowie SPECK und URICH (1969) die mannigfaltigen Kohlenhydratstoffwechselwege bei den Decapoden sichern und erweitern.

Bei den Untersuchungen des Kohlenhydratspektrums des Flußkrebses (SPECK 1967) wurden an Monosacchariden und deren Derivaten Glucose, Galactose, Fructose, N-Acetylhexosamin, Glucuronsäure und Zuckerphosphate gefunden. An Oligosacchariden kommen Trehalose, Maltose, Maltotriose und Maltotetrose vor. Außer Glykogen gibt es offenbar weitere Polysaccharide mit den Bausteinen Glucose, Galactose, Fucose, Glucosamin, Galactosamin und Hexuronsäuren. Die Isolierung und Charakterisierung dieser Polysaccharide wird zur Zeit durchgeführt(HERZ). SPECK stellte fest, daß sich der Kohlenhydratbestand im Jahresablauf und im Zusammenhang mit der Häutung außerordentlich stark ändert. Viele Autoren haben sich mit der hormonalen Kontrolle des Kohlenhydratstoffwechsels bei decapoden Crustaceen befaßt: ABRAMOWITZ et al. (1944), KLEINHOLZ und LITTLE (1949), SCHEER und SCHEER (1951), SCHEER (1959), McWHINNIE und SALLER (1960), McWHINNIE und CHUA (1964), KELLER (1965, 1966, 1969a) und RAMAMURTHI et al. (1968). Eine zusammenfassende Übersicht über die Blutzuckerregulation gibt KELLER (1969b).

Eine Aufgabe dieser Arbeit sollte darin bestehen, festzustellen, welche der nach dem bekannten Schema (s. Anhang) ablaufenden Kohlenhydratumwandlungen von der Enzymausstattung her bei Crustaceen möglich sind. Dazu gehört die Untersuchung der Frage inwieweit die Vielzahl der Monosaccharide des Flußkrebses aus Glucose entstehen können und welche Möglichkeiten

bestehen, diese in die Glykolyse einzuschleusen. Außerdem sollte ein Vergleich des Enzymspektrums der verschiedenen Organe organ-spezifische Unterschiede des Stoffwechsels aufzeigen.

2 Stoffwechsel der Fructose

Im Gegensatz zu den Hauptwegen des Kohlenhydratstoffwechsels kann die Umwandlung von Fructose zu Glucose und umgekehrt über nicht-phosphorylierte Produkte verlaufen. Bei den Crustaceen ist darüber nichts bekannt. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen aber den Schluß zu, daß auch bei den Crustaceen dieser Stoffwechselweg von der Enzymausstattung her möglich ist. Dabei liegt die Aktivität der SDH für die Umwandlung von Fructose in Sorbit in der Antennendrüse um etwa den Faktor 20 höher als die der Aldosereductase, welche die Umwandlung von Glucose in Sorbit katalysiert. Das um Glucose konkurrierende Enzym Hexokinase ist in der Antennendrüse mit seinen höchsten Aktivitäten vertreten (KELLER 1964); die etwa um den Faktor 100 größere Aktivität zeigt den Vorrang des über phosphorylierte Produkte ablaufenden Glucosestoffwechsels. Interessant ist, daß die SDH eine, wenn auch bedeutend geringere, Aktivität mit NADPH zeigt, während die Aldosereductase mit NADH inaktiv war. Von der Aldosereductase wurden auch Galactose und Mannose umgesetzt, letztere allerdings nur mit sehr geringer Geschwindigkeit. Nach SPECK (1967) tritt Fructose nur im Frühjahr besonders im Blutzucker auf. Mannose konnte in kleinen Mengen als Polysaccharidbaustein gefunden werden. Hinweise über die Funktion der freien Fructose liegen nicht vor. Neben dem bekannten Vorkommen bei Säugetieren in Zusammenhang mit der Fortpflanzung ist Fructose bei Insekten verschiedentlich nachgewiesen worden (zusammenfassend WYATT 1967).

VAN HANDEL (1969) hat bei dem Moskito Aedes sollicitans durch Tracer-Versuche festgestellt, daß ein Gleichgewicht Sorbit=Fructose sehr schnell erreicht wird, daß aber eine Aldosereductase fehlt. Glucose ist also kein Intermediärprodukt bei der Synthese von Trehalose und Glykogen aus Fructose. Fructose wird offensichtlich phosphoryliert, zu G-6-P isomerisiert und weiter zu UDPG

umgewandelt. Die Aldosereductase wurde aber bei anderen Insekten nachgewiesen, so in der Puppe des weißlings Pieris (SØLME und VELLE 1968)[1] und in Seidenraupeneiern (CHINO 1960)[1]. WENZL (1969b) kann für Calliphora noch nicht entscheiden, ob die Umwandlung über die Phosphorylierung oder über Glucose erfolgt. Er hält aber den Umweg über C_3-Körper, der bei den Säugern am häufigsten anzutreffen ist, für unwahrscheinlich. Nach Befunden von WENZL (1969a) ist die Aktivität der SDH bei verschiedenen Insekten sehr unterschiedlich. Bei weitem die höchste Aktivität zeigt Calliphora, bei der in der Thoraxmuskulatur 920 mU/mg Protein nachgewiesen wurde. REX et al. (1969) kommen nach Untersuchungen der Aldosereductase von Säugetieren zu dem Schluß, daß die Polyol-Bildung aus Aldosen ein normaler Stoffwechselweg in vielen Säugetiergeweben ist.

Meine Vermutung, daß F-1-P und FDP auch bei Orconectes von zwei verschiedenen Aldolasevarianten umgesetzt werden, mußte nach der Arbeit von LEBHERZ und RUTTER (1969) modifiziert werden. Diese Autoren kamen durch detaillierte Untersuchungen an Crustaceen zu der Ansicht, daß die Unterschiede in den FDP/F-1-P-Verhältnissen auf proteolytische Modifikationen einer Aldolase zurückzuführen sind und nicht auf gewebsspezifische multiple Formen der Klasse I-Aldolasen wie bei den Wirbeltieren. Die Frage, inwiefern F-1-P im Flußkrebs überhaupt umgesetzt wird, muß offen gelassen werden, da die Michaeliskonstante extrem hoch ist. Nach dem allgemeinen Stoffwechselschema verläuft der Abbau der freien Fructose in etwas anderer Weise als der Glucoseabbau, obwohl Fructosephosphate Zwischenprodukte des Embden-Meyerhof-Schemas sind. Nach Phosphorylierung zu F-1-P zerlegt die 1-Phosphofructaldolase das Zuckerphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd; dieser Schritt entspricht der Aldolasereaktion der Glykolyse. Wie bei der SDH muß festgestellt werden, daß freie Fructose nur im Frühjahr in meßbaren Mengen beim Flußkrebs gefunden wird. Ob der Abbau dieser Fructose über nichtphosphorylierte Produkte oder F-1-P verläuft, kann nicht entschieden werden. Es sollte untersucht werden, ob die betreffenden Enzyme jahreszeitliche Veränderungen durchmachen.

---

1 Zit. nach VAN HANDEL (1969)

3 Stoffwechsel der Galactose

Es ist nicht sicher, ob eine Umwandlung der Galactose zu Glucose und damit eine Einschleusung in die Glykolyse entsprechend dem allgemein bekannten Stoffwechselschema (s. CUATRECASAS und SEGAL 1966) beim Flußkrebs stattfindet:

Galactose + ATP = Ga-1-P + ADP	Galactokinase
Ga-1-P + UDPG = UDPGa + G-1-P	Uridyltransf.
UDPGa = UDPG	UDPGEP
UDPG + PP = G-1-P + UTP	UDPG-pyrophosphorylase

WOLTER (1966) konnte bei Orconectes keine Galactokinase nachweisen; die Existenz der übrigen drei Enzyme beim Flußkrebs deutet aber diese Möglichkeit des Galactosestoffwechsels an. Untersuchungen über das Vorkommen einer UDP-galactose-pyrophosphorylase bei Crustaceen, entsprechend der von JANTZEN (1967) beim Flußkrebs festgestellten UDP-glucose-pyrophosphorylase, stehen noch aus. Dieses Enzym könnte den Austausch zwischen Galactose und Glucose, wie er durch die Hexose-1-P-uridyltransf. offenbar nur in geringem Umfang katalysiert wird, durch eine direkte Reaktion zwischen Ga-1-P und UTP ersetzen. Für die geringe Bedeutung dieses Stoffwechsels sprechen außer einer nicht meßbaren Galactokinase - Aktivität die sehr niedrigen Aktivitätswerte der Uridyltransferase.

Wie das Vorkommen von Galactose und Galactosamin als Polysaccharidbausteine sowie von freier Galactose beim Flußkrebs (SPECK 1967) zeigt, dürften die hier besprochenen Enzyme weniger für das Einschleusen von Galactose in den Hexosephosphatstoffwechsel als vielmehr für Synthesen, bei denen Galactose benötigt wird (Polysaccharide, Galactolipide, Glykoproteine), eine Rolle spielen.

Bei den Untersuchungen der Galactosedehydrogenase ergab sich kein Hinweis darauf, daß wie bei Säugetieren und Bakterien ein Galactosestoffwechselweg über nichtphosphorylierte bzw. Uridinnucleotid-verknüpfte Intermediärprodukte beim Flußkrebs existiert. Es scheint, daß dieser von der Galactose zur Xylulose führende oxydative Weg eine Alternative zum oben angeführten dienen kann (CUATRECASAS und SEGAL 1966).

4 UDPG-dehydrogenase und Glucuronsäurestoffwechsel

Bei der Bestimmung der UDPGDH konnte keine Aktivität gefunden werden, obwohl PUYEAR (1967) bei Callinectes eine schwache Aktivität nachgewiesen hat. Er beschreibt insgesamt vier Enzyme des Glucuronsäurestoffwechsels; dabei scheint der Stoffwechselweg UDP-glucuronat→Glucuronat-1-P→Glucuronat im Vergleich zu UDP-glucuronat→Glucuronid→Glucuronat (s. Anhang) der aktivere zu sein. Eingeleitet wird dieser Weg durch die Oxydation der UDPG durch die UDPGDH. SPECK (1967) fand Hexuronsäuren als Polysaccharidbausteine bei Orconectes und Glucuronsäure in Bindung an eine noch unidentifizierte ninhydrinpositive Substanz. Bekanntlich binden Wirbeltiere Phenole und andere Farbstoffe als ß-Glucuronide, die Insekten dagegen als ß-Glucoside. Beim Flußkrebs scheinen Glucuronide keine Rolle bei Entgiftungsprozessen zu spielen, wohl aber Glucoside (ZABEL, unveröffentlicht). Obwohl der Glucuronsäurestoffwechsel bei einem Vertreter der Crustaceen zumindest von der Glucose zu Glucuronsäure nachgewiesen wurde, ist nicht bekannt, ob die Crustaceen auf diesem Weg Ascorbinsäure aus Glucose zu synthetisieren vermögen, oder ob dieses Vitamin ein essentielles ist.

5 Bakterielle Polyol-dehydrogenasen

Die Untersuchung der bakteriellen Polyol-dehydrogenasen sollte zeigen, ob sich auch beim Flußkrebs Fructose-6-P mit NADH als Cosubstrat umsetzt. Die Verbreitung dieser Enzyme ist aber doch wohl auf Mikroorganismen beschränkt.

6 Phosphoglucosamin-isomerase

Der Zusammenhang der PGI als ein Schlüsselenzym der Hexosaminbildung mit der Chitinsynthese konnte wahrscheinlich gemacht werden (s. auch Kapitel Chitinsynthese). Bei Mikroorganismen und Säugetieren (GHOSH et al. 1960, GHOSH und ROSEMAN 1962, POGELL 1962) aber auch bei Insekten (CANDY und KILBY 1962) wurde die Glutamin-fructose-6-phosphat-aminotransferase (EC: 2.6.1.16) festgestellt, die auch Glucosamin-6-P aus Fructose-6-P synthetisiert, aber L-Glutamin als spezifischen NH_3-Donator benötigt. Dieses Enzym soll recht instabil sein und konnte von mir in Vorversuchen nicht nachgewiesen werden.

7 Pentosephosphat-cyclus

Die Aktivität der G6PDH mit F-6-P als Substrat konnte auf die Umwandlung zu G-6-P durch die Hexosephosphat-isomerase zurückgeführt werden. Mit NAD^+ als Cosubstrat war die G6PDH inaktiv.

Die beiden durch oxydative Schritte den Pentosephosphat-cyclus einleitenden Enzyme zeigen keine Proportionskonstanz; dagegen stehen die Transaldolase und Transketolase in konstanten Aktivitätsverhältnissen zueinander.

Die Bedeutung des Pentosephosphat-cyclus liegt darin, Pentosephosphate (zum Aufbau von Nucleinsäuren, Coenzymen, Polysacchariden) und reduziertes $NADP^+$ bereitzustellen, das für viele Synthesen (Fettsäuren, Sterine) und u.a. auch für die Glukoneogenese gebraucht wird. Wenn mehr Pentosen als NADPH gebraucht werden, wird bevorzugt der Weg über die nichtoxydativen Umwandlungen von Hexose- und Pentosephosphaten eingeschlagen (Summenformel nach MAHLER und CORDES 1966: 6 Pentose-5-P + H_2O = 5 Glucose-6-P + P_i). Wird sehr viel NADPH benötigt, kann durch den oxydativen Pentosecyclus ein Überschuß von Pentosen in Hexosen zurückverwandelt werden (MAHLER und CORDES: 6 Glucose-6-P + 12 $NADP^+$ = 5 Glucose-6-P + 6 CO_2 + 12 NADPH + P_i). Über die Regulation des Pentosephosphat-cyclus sind etliche Einzelheiten bekannt; man ist aber noch weit davon entfernt, einen Überblick geben zu können (zusammenfassend PONTREMOLI und GRAZI 1969). Nach übereinstimmender Auffassung ist der oxydative Abbau der Glucose zu CO_2 nicht der Hauptabbauweg der Glucose, und die Aktivität des Pentosephosphat-cyclus i.a. gering zu der der Glykolyse. So schätzen McWHINNIE und CORKILL (1964), daß etwa 10% des vorhandenen Glucose-6-P bei Zwischenhäutungstieren von Orconectes durch den Pentosephosphat-cyclus umgesetzt werden. PUYEAR et al. (1965) kommen zu dem Ergebnis, daß der Pentosephosphat-cyclus bei Zwischenhäutungstieren von Pacifastacus einen kleineren Anteil am Glucosestoffwechsel hat als die Glykolyse und sogar der Glucuronatweg.

Vergleicht man Enzyme verschiedener Reaktionsketten, so zeigen sich neben Übereinstimmungen einzelner Organe weitgehende Unterschiede ("Spezifische Proportionen"). Diese

organspezifischen Proportionen sind nach PETTE (1965) ein gutes Maß für die biochemische Spezialisierung der Organe. Um eine Übersicht über die relative Bedeutung von Glykolyse und oxydativen bzw. nichtoxydativen Pentoseweg in den verschiedenen Organen zu erhalten, wurde der Quotient aus Aldolaseaktivität und der Aktivität der 6-Phosphogluconat-dehydrogenase bzw. Transaldolase gebildet (Tab. 6). Zusätzlich wurde, um einen direkten Vergleich der Bedeutung des oxydativen und nichtoxydativen Pentosewegs zu erhalten, auch der Quotient 6PGDH/TA angegeben. Die Quotienten CS/6PGDH und CS/TA unterstreichen die Bedeutung der einzelnen Organe für die Energiegewinnung bzw. für die Syntheseleistung oder Pentosephosphatanlieferungen. Dies geschieht unter der Voraussetzung, daß die entsprechenden Enzymaktivitäten ein Maß für die Intensität der Reaktionsketten darstellen. Nach KELLER (1964) kann die Aldolase beim Flußkrebs als ein adäquates Maß für die gesamte Glykolyse angesehen werden, ebenso die Citratsynthase für den Citratcyclus. Er vergleicht auch das Verhältnis von Aldolase zur Citratsynthase für die verschiedenen Organe (Tab. 6). Leider stehen für die Enzyme der Fettsynthese beim Flußkrebs noch keine Aktivitäten für die verschiedenen Organe fest; GRASZYNSKI (1968a) hat schon festgestellt, daß auch hier offenbar der Malonyl-CoA-Weg zur Synthese langkettiger, gesättigter Fettsäuren wirksam ist; er hat dabei die Beobachtung gemacht, daß NADPH nicht eindeutig dem NADH vorgezogen wird.

Es überrascht nicht, daß der auf glykolytischen Abbau der Kohlenhydrate spezialisierte Schwanzmuskel (Ald./CS = 117) nur geringe Aktivitäten des Pentosephosphat-cyclus zeigt (Ald/6PGDH = 292), während Integumentgewebe und Kiemen im Vergleich zu den anderen Organen höhere Enzymaktivitäten des Pentosephosphat-cyclus als der Glykolyse haben (Ald./6PGDH<1; Ald./TA = 1,2). Gerade diese Organe zeigen auch im Vergleich zu anderen Organen höhere Fettsäure-abbauende als Kohlenhydrat-abbauende Enzymaktivitäten (GRASZYNSKI 1968b) und haben, wie der Quotient Ald./CS zeigt, neben Herz und Mitteldarmdrüse einen weitgehend aeroben Stoffwechsel (vgl. KELLER 1964). Der Quotient CS/6PGDH unterstreicht noch einmal nachdrücklich

für das Herz diese Feststellung. Im Verhältnis zu der ebenfalls sehr hohen Aktivität der Aldolase fällt die relativ zu den anderen Organen mittlere Aktivität der 6PGDH im Herzen allerdings nicht ins Gewicht. Im vorwiegend glykolytisch ausgerichteten Bauchmark scheint der nichtoxydative, in der Antennendrüse der oxydative Pentoseweg zu dominieren (6PGDH/TA = 0,7 bzw. 6,4). Antennendrüse und Hoden müssen offenbar besonders hohe Syntheseleistungen erbringen (CS/6PGDH = 0,1), der Hoden überdies die stärkste Pentosephosphaterzeugung, während die Kiemen dafür die niedrigsten Werte zeigen (CS/TA = 0,2 bzw. 1,2).

	$\frac{\text{Ald.}}{\text{6PGDH}}$	$\frac{\text{Ald.}}{\text{TA}}$	$\frac{\text{6PGDH}}{\text{TA}}$	$\frac{\text{CS}^{1)}}{\text{6PGDH}}$	$\frac{\text{CS}^{1)}}{\text{TA}}$	$\frac{\text{Ald.}^{1)}}{\text{CS}^{1)}}$
Schwanzmuskel	292	—	—	1,4	—	117
Herz	42	—	—	6,7	—	1,0
Bauchmark	9,7	7,3	0,7	0,4	0,3	7,5
Enddarm	2,2	4,3	2,0	0,3	0,5	2,6
Antennendrüse	1,2	7,6	6,4	0,1	0,9	3,0
Hoden	1,2	1,4	1,2	0,1	0,2	2,0
Integumentgewebe	0,9	1,2	1,3	0,5	0,7	1,2
Kiemen	0,6	1,2	1,9	0,6	1,2	0,3

Tab.6 Verhältnis der Aktivitäten Fructosediphosphataldolase (Ald.) zu 6-Phosphogluconat-dehydrogenase (6PGDH) bzw. Transaldolase (TA) und von 6PGDH zu TA, von Citratsynthase (CS) zu 6PGDH bzw. TA und von Ald. zu CS für die verschiedenen Organe des Flußkrebses.

Literatur: 1) KELLER (1964)

8 Charakterisierung der einzelnen Organe

Es soll nun versucht werden, die wichtigsten Organe etwas ausführlicher zu charakterisieren, unter Verwendung der im Verlauf meiner Untersuchungen und der am hiesigen Institut gewonnenen Ergebnisse. Die Problematik des Vergleichs zu verschiedenen Zeiten gemessener Enzymaktivitäten, bestimmt an Homogenaten, die unterschiedlich stark zentrifugiert wurden, wurde schon diskutiert. Zur vergleichenden Analyse sollen aber einmal alle die von mir untersuchten Enzymaktivitäten zusammenfassend dargestellt werden (Tab. 7); dazu kommt noch die Citratsynthase als Schlüsselenzym des Citratcyclus. Die Monate, in denen die Meßserien durchgeführt wurden, sind jeweils angegeben. Der Vergleich wird erleichtert, wenn die Enzymaktivität in dem jeweils aktivsten Organ gleich 100 gesetzt und die Aktivität in den übrigen Organen als Prozent dieses Maximalwerts ausgedrückt wird. (Die meist nur in der Antennendrüse gemessenen Aktivitäten der Oxydoreductasen wurden nicht in die Tabelle aufgenommen).

Herz- und Schwanzmuskel von Orconectes stellen wie Herz- und Skelettmuskel von Säugetieren in ihrer Enzymausstattung ausgesprochene Gegensätze dar. Während im Schwanzmuskel nur die Enzyme des Glykogenstoffwechsels und der Glykolyse in hoher Konzentration vorliegen und der anaerobe Kohlenhydratabbau bevorzugt wird, haben im Herzen auch die Enzyme des Citratcyclus, des Fettsäureabbaus, des Ketonkörperstoffwechsels und des Aminosäurestoffwechsels (URICH 1967) extrem hohe Aktivitäten; als Dauerleistungsorgan mit besonders guter Sauerstoffversorgung bevorzugt das Herz wie die Herzen von Säugetieren den aeroben Kohlenhydrat- bzw. Fettsäureabbau. Der Pentosephosphat-cyclus scheint in beiden Organen nur eine sehr untergeordnete Rolle zu spielen. Von den Enzymen des Galactosestoffwechsels ist die Uridyltransf. mit schwachen Aktivitäten im Schwanzmuskel vertreten. Während der Schwanzmuskel nur geringe Hexosamin synthetisierende Aktivitäten zeigt, gehört dabei das Herz zu den aktivsten Organen - besonders bei Zwischenhäutungstieren.

	Ad	Ki	Ed	Ho	Ig	He	Bm	Md	Mu
G6PDH (Nov.)	100	83	73	54	25	3	—	—	—
6PGDH (Feb./März)	100	29	44	13	15	9	18	0	1
(Juni)	100	31	51	22	23	13	24	—	—
(Nov.)	100	23	38	13	9	8	—	—	—
TA (Apr.)	65	63	92	45	47	—	100	—	—
TK (Juli)	47	21	58	25	23	0	100	1	—
UDPGEP (Nov.)	47	9	100	17	40	—	—	4	0
Uridyl-transf. (Sep./Okt.)	20	100	0	50	100	—	—	100	30
Ald. (Jan.)	31	5	25	4	3	92	45	—	100
1PFA (Jan.)	52	11	46	11	17	100	43	—	89
(Apr.)	13	—	8	2	—	32	20	—	100
PGI (Juli/Aug.)	86	62	100	26	54	41	57	27	5
(Okt.)	75	24	100	30	34	87	65	3	4
CS[1)] (Febr.)	25	32	20	3	14	100	13	13	3

Tab. 7 Verteilung verschiedener Enzymaktivitäten auf die Organe des Flußkrebses. Jeweils höchste Aktivität gleich 100 gesetzt, übrige Werte in Prozent dieser Maximalaktivität.
Organe: Ad = Antennendrüse, Bm = Bauchmark, Ed = Enddarm, He = Herz, Ho = Hoden, Ig = Integumentgewebe, Ki = Kiemen, Md = Mitteldarmdrüse, Mu = Muskel
Enzymabkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Literatur: 1) KELLER (1964)

Neben dem Herzen besitzt auch die Antennendrüse ein komplexes Spektrum mittlerer bis hoher Enzymaktivitäten der Glykolyse, des Citratcyclus, des Fettsäureabbaus und des Aminosäurestoffwechsels. Die oxydativen Enzyme des Pentosephosphat-cyclus haben von allen Organen hier ihre höchste Aktivität, während die Transferasen mittlere Werte erreichen. Der oxydative Pentoseweg dominiert in der Antennendrüse, wobei schon KELLER (1964) die Möglichkeit andeutet, daß die Syntheseprozesse in Zusammenhang mit einer der wesentlichen Funktionen der Antennendrüse, der Resorption zahlreicher Stoffe und damit aktiver Transportvorgänge, stehen (vgl. BINNS 1969). Dies erklärt auch den hohen energieliefernden Stoffwechsel. Dagegen zeigt die Antennendrüse niedrige Werte für Pentosesynthesen. Das Bild eines sehr vielseitigen Organs wird durch die Aktivitätswerte der Enzyme des Galactosestoffwechsels, der Hexosaminbildung und der nichtphosphorylierenden Fructose-Glucose-Umwandlung abgerundet.

Ein überraschend komplexes Spektrum hoher Enzymaktivitäten besitzt auch der Enddarm, was URICH (1968) zu der Annahme veranlaßt, daß dieses Organ keineswegs nur die Aufgabe der Ableitung der Faeces hat, sondern daneben noch vielseitige Funktionen der Stoffumwandlung. In dieses Bild fügen sich meine Ergebnisse gut ein: mit hohen Aktivitäten sind die Enzyme der nichtoxydativen Pentose-Hexose-phosphat-Umwandlung, mit etwas niedrigeren die der Dehydrogenasen vorhanden. Die UDPG-epimerase hat im Enddarm ihre höchste Aktivität, ebenso die Phosphoglucosamin-isomerase.

Aus den spezifischen Proportionen des Hodens läßt sich deutlich seine Spezialisierung ablesen. Geringen Aktivitäten der Glykolyse und des Citratcyclus stehen hohe Kapazitäten der Pentosephosphaterzeugung und Syntheseleistungen gegenüber; diese stehen vermutlich im Zusammenhang mit der Spermabildung. Die Enzyme des Galactosestoffwechsels, des FDP-Abbaus und der Hexosamin-Synthese weisen unterdurchschnittliche Aktivitäten auf.

Im Integumentgewebe sind die Enzyme der Glykolyse und des Citratcyclus ebenfalls nur in geringen Konzentrationen enthalten. Die spezifischen Proportionen lassen erkennen, daß im

Verhältnis dazu die Kapazität des oxydativen- und nichtoxydativen Teils des Pentosephosphat-cyclus ausgeprägter vorhanden ist, was auf den Zusammenhang mit der Häutung schließen läßt; vermutlich lassen sich darauf auch die hohen Aktivitäten des Galactosestoffwechsels zurückführen. Im Zusammenhang mit der Chitinsynthese dürften die hohen Aktivitätswerte der Trehalase (JANTZEN 1967) und der PGI stehen. Die Kieme stimmt im wesentlichen mit der Charakterisierung des Integumentgewebes überein, jedoch ist ihr Kohlenhydratabbau noch stärker oxydativ ausgerichtet, was sicher im Zusammenhang mit der guten Sauerstoffversorgung steht. Der ausgeprägte Pentosephosphat-cyclus kann wie bei der Antennendrüse als Ausdruck aktiver Transportleistungen angesehen werden (Ionenaufnahme).

Im Bauchmark überwiegt die Glykolyse gegenüber dem Citratcyclus. Der nichtoxydative Pentoseweg ist stark ausgeprägt. Auch die Aktivität der PGI ist überdurchschnittlich hoch. Nicht nur hinsichtlich des energieliefernden Kohlenhydratabbaus scheint die Mitteldarmdrüse zu den am wenigsten stoffwechselaktiven Organen des Flußkrebses zu gehören. Der Pentosephosphat-cyclus ist kaum meßbar, nur die allgemein mit sehr schwachen Aktivitäten aufgefundene Uridyltransf. hat hier eine relativ hohe Aktivität. Die wahre Bedeutung der Mitteldarmdrüse für den Stoffwechsel dürfte sich aber erst mit Tracer-Versuchen feststellen lassen.

Zu dem Phänomen, daß die spezifischen Aktivitäten der meisten Enzyme des Flußkrebses in der gleichen Größenordnung wie bei den Säugetieren liegen, obgleich der Sauerstoff-Verbrauch eines Flußkrebses etwa um den Faktor 50 - 100 niedriger ist als der gleich großer Säuger, stellt URICH (1968) die Arbeitshypothese auf, "daß bei Orconectes zwar die Intensität der energieliefernden oxydativen Stoffwechselprozesse, der "Betriebsstoffwechsel", durch intrazelluläre Regulationsmechanismen stark gedrosselt ist, die Prozesse des Auf-, Ab- und Umbaus körpereigener Substanzen, der "Baustoffwechsel", jedoch rasch ablaufen. Für die Crustaceen wäre eine hohe Geschwindigkeit der Baustoffwechsel-Prozesse biologisch durchaus sinnvoll, da sie im Verlaufe des Jahrescyclus zum Teil sehr rasche Veränderungen ihrer Körperzusammensetzung zeigen und sich an veränderte innere und äußere Bedingungen rasch anpassen müssen".

II CHITINSYNTHESE

Material und Methodik

1 Tiermaterial

Die Messungen der Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivität im Integumentgewebe, die Chitinisolierung und die Bestimmung der Einbaurate von ^{14}C-Glucose in Chitin erfolgte im Zusammenhang mit der Häutung. Adulte Flußkrebse häuten sich in den Monaten Juni bis Mitte September zwei- bis dreimal schnell hintereinander. Für die Untersuchung wurde eine "repräsentative" Häutung angenommen (vgl. SPECK 1967) und dabei die Voraussetzung gemacht, daß sich die Krebse vor jeder Häutung im gleichen physiologischen Zustand befinden. Dazu war vorteilhaft, daß die Untersuchung zum Ende der Häutungsperiode ausgeführt wurde und alle definierten Nachhäutungstiere zu keiner neuen Häutung ansetzten.

80 Tiere, deren Gewicht zwischen 15 und 33 g schwankte, wurden in 15 Häutungsstadien eingeteilt. Da nach STEVENSON et al. (1968) keine eindeutige Korrelation zwischen den verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen besteht, und die Beurteilung der Entwicklungsstadien der Uropodenborsten mit Fehlern behaftet ist, war nur eine grobe Einteilung der Vorhäutungsstadien möglich. Sie erfolgte in Anlehnung an DRACH (1939), modifiziert für Orconectes nach STEVENSON et al. (1968) und KELLER (persönliche Mitteilung). Zur Bestimmung der einzelnen Vorhäutungsstadien wurden als Bewertungsgrundlage die Entwicklungsstadien der neuen Uropodenborsten unter der alten Kutikula benutzt. Daneben wurden zur genaueren Bestimmung noch weitere Kriterien herangezogen:

C_4-Stadium: keine Magensteine; fester schwarzer Panzer

D_0 " : noch keine neuen Borsten erkennbar; erste Andeutung von Gastrolithen

D_1 " : neue Uropodenborsten erkennbar; Gastrolithen größer als in D_0; Integumentgewebe läßt sich noch nicht von der alten Kutikula trennen.

D_2 " : Integumentgewebe läßt sich nach vollendeter "Apolyse" (JENKIN und HINTON 1966) als Ganzes von der alten Kutikula abheben.

D_3-Stadium: lange Uropodenborsten und größere Gastrolithen als in D_2; noch kein Häutungsspalt am Carapax erkennbar

D_4-Stadium: deutlicher Häutungsspalt am Carapax

Die gesamte Vorhäutungsphase dauert etwa drei Wochen. Über die Dauer der einzelnen Stadien lassen sich keine genauen Angaben machen. Die zeitliche Grobeinteilung der Nachhäutungsstadien A, B und C wurde nach STEVENSON (1968) vorgenommen. Das A-Stadium (A_1, A_2) beginnt unmittelbar nach der Häutung und dauert etwa einen Tag, das sich anschließende B-Stadium ein bis drei Tage; die Dauer des C-Stadiums (C_1-C_4) ist sehr unterschiedlich und endet mit dem Beginn des D_0-Stadiums.

2 Chitinbestimmung

Den Krebsen wurden je 1 µC D-Glucose-U-^{14}C der spezifischen Aktivität 309 mC/mM (Radiochemical Centre, Amersham), gelöst in 25 µl Harreveld-Saline, ins Pericard injiziert. Infolge der hohen spezifischen Aktivität des Tracers wurde durch die Injektion die natürliche Konzentration von Glucose nur unwesentlich erhöht ($< 1\%$). Die eingesetzte Aktivität ergab als Standard etwa $1{,}3 \cdot 10^6$ Ipm. Die Tiere wurden einzeln für 15 min in 250 ml Wasser gesetzt; die aus der Injektionswunde in das Wasser austretende Aktivität wurde gemessen und von der injizierten Aktivität abgezogen. Nach einer Stunde wurde das Tier getötet, schnell zerkleinert, mit 4 Vol. Methanol mit dem "Ultra-Turrax" (Janke und Kunkel, Staufen i.Br.) homogenisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gehalten. Vorher wurde das Integumentgewebe einer Carapaxhälfte entfernt und zur Messung der Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivität verwendet.

Die Isolierung des Chitins erfolgte durch mehrmalige Behandlung mit heißer und kalter KOH, HCl sowie einem Äthanol-Dioxan-Gemisch (vgl. SPECK und URICH 1969). Das getrocknete Chitin wurde zur Aktivitätsbestimmung in konz. HNO_3 gelöst und der Szintillationslösung zugegeben. Für die Messung der Radioaktivität wurde ein Flüssigszintillationszähler der Fa. Tracerlab, Antwerpen benutzt. Als Szintillationslösung diente Toluol-Methanol (4:1) mit 50 mg/l POPOP und 4 g/l PPO. Quenchkorrektur

erfolgte mit der Kanalverhältnismethode. Es wurden stets mindestens $5 \cdot 10^3$ Impulse gezählt.

3 Enzymaktivitätsbestimmung, Proteinbestimmung und Statistik

wurden bereits in Kapitel I angegeben. Die Chitingewichte für den "Standardkrebs" von 20 g Gewicht wurden - ebenso wie die maximalen Abweichungen- aus den graphischen Darstellungen der Regressionsgeraden der transformierten Werte (log des Chitingewichts in Abhängigkeit vom Körpergewicht) in jedem einzelnen Stadium bestimmt. Dabei wurde eine exponentielle Wachstumsfunktion $y = a \cdot e^{b \cdot x}$ angenommen.

Ergebnisse

Tabelle 8 zeigt die Aktivität [mU/mg Protein] der Phosphoglucosamin-isomerase (PGI) im Integumentgewebe in verschiedenen Stadien bzw. Zeiträumen vor und nach der Häutung, dazu die Einbauraten von Glucose-U-^{14}C in Chitin [% der injizierten Aktivität] eine Stunde nach Injektion in das Hämocoel und die Chitingewichte, die den Tieren in diesen Stadien zukommen [mg Chitin, bezogen auf den "Standardkrebs" von 20 g Körpergewicht] . Alle drei Bestimmungen wurden an den selben Versuchstieren in den Monaten August bis September vorgenommen. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Stadium bzw. Tage n.d.Htg.	Zahl der Vers.tiere	Aktivität der PGI	Einbaurate	Chitingewicht
C_4	4	8,1 ± 2,1	1,1 ± 0,8	1198 ± 60
D_0	9	9,1 ± 1,1	1,0 ± 0,8	975 ± 70
D_1	5	8,6 ± 1,1 **	0,8 ± 0,6	860 ± 100
D_2	5	15,2 ± 1,5	1,0 ± 0,5	720 ± 21
D_3	5	14,3 ± 2,6	1,1 ± 0,3	700 ± 40
D_4	5	14,7 ± 1,5	0,8 ± 0,3 **	540 ± 40
Häutung	5	18,8 ± 4,0	17,2 ± 1,5	155 ± 12
3 h nach d. Häutg.	7	21,8 ± 6,2	21,6 ± 3,2 **	152 ± 6
8 h nach d. Häutg.	6	18,3 ± 4,9	32,5 ± 5,1 *	160 ± 6
24 h nach d. Häutg.	5	17,4 ± 2,8	50,9 ± 11,9	220 ± 24
2 Tage n. d. Häutg.	4	19,0 ± 4,6	44,6 ± 5,4 *	270 ± 16
8 Tage n. d. Häutg.	5	14,9 ± 1,5 *	28,9 ± 5,3	470 ± 40
24 Tage n. d. Häutg.	5	12,4 ± 0,9 *	24,2 ± 8,9	650 ± 55
35 Tage n. d. Häutg.	4	9,9 ± 1,5 *	14,6 ± 5,3 *	730 ± 100
47 Tage n. d. Häutg.	4	7,6 ± 0,4	0,8 ± 0,5	863 ± 100

Tab. 6 Enzymaktivität der Phosphoglucosamin-Isomerase (PGI) im Integumentgewebe in verschiedenen Stadien bzw. Zeiträumen vor und nach der Häutung [mU/mg Protein]. Dazu die Einbaurate von Glucose-U-^{14}C in Chitin [% der injizierten Aktivität, 1 h nach Injektion] und das Chitingewicht eines "Standardkrebses" von 20 g Körpergewicht [mg Chitin ± maximaler Abweichung].
** bedeutet: $P < 0{,}0027$ (hochsignifikant)
* " : $0{,}05 > P > 0{,}0027$ (signifikant)
Die Werte für die Aktivität der PGI zwischen D_4-Stadium und 3 h nach der Häutung sowie zwischen 3 h nach der Häutung und 8 Tagen nach der Häutung sind statistisch signifikant verschieden; die Werte zwischen 24 und 47 Tagen nach der Häutung sind hochsignifikant verschieden. Die Werte für die Einbauraten zwischen 8 und 35 Tagen nach der Häutung sind signifikant verschieden.

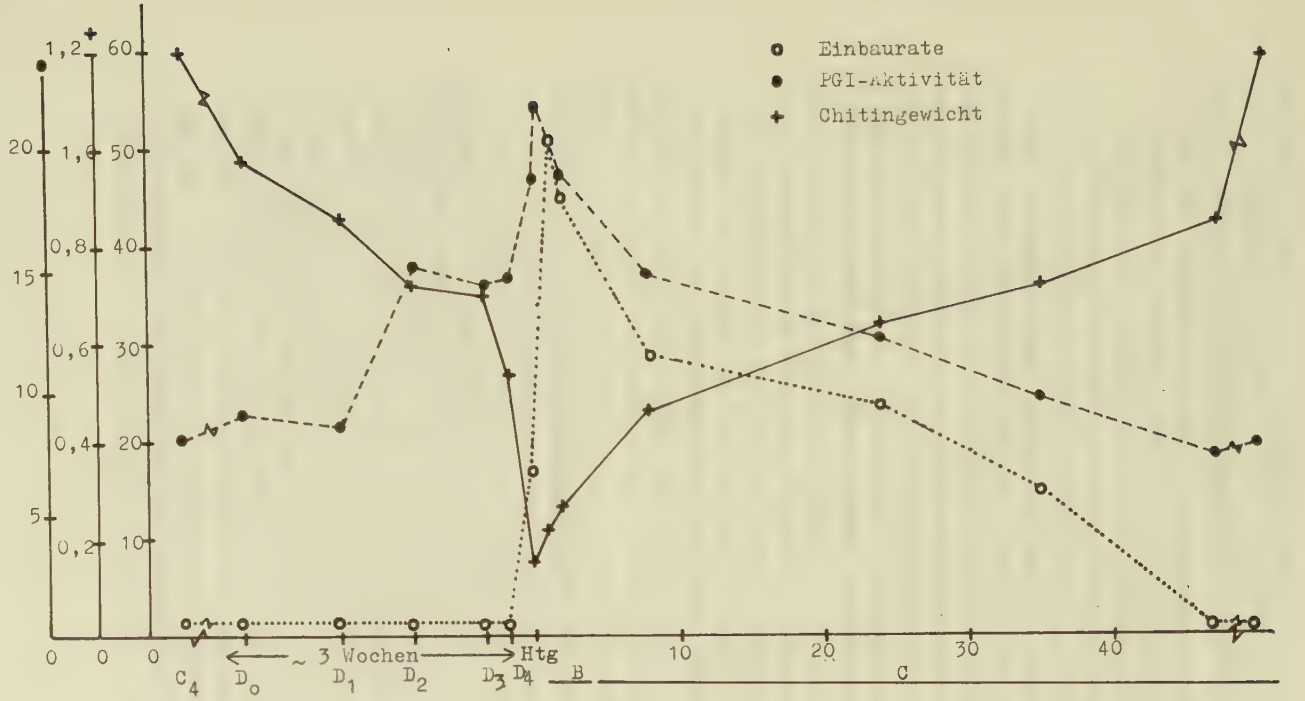


Abb. 1 Veränderungen der Aktivität [mU/mg Protein] der Phospho-glucosamin-isomerase (PGI)●, der Einbaurate von Glucose-U-^{14}C [% der injizierten Aktivität]○ und dem Chitingewicht[g Chitin]+ im Zusammenhang mit der Häutung.

DISKUSSION

1 Einbau von Glucose-U-^{14}C in Chitin und Chitingewicht

Der Einbau markierter Glucose in Chitin wurde schon bei mehreren Decapoden untersucht, doch wurden meines Wissens noch nie so hohe Einbauraten beobachtet. Schon 1 h nach der Injektion ist die Glucose bei frischgehäuteten Tieren zur Hälfte in Chitin inkorporiert. Auffallend ist, daß in den Vorhäutungsstadien D_0-D_4 nur dieselben geringen Einbauraten gefunden wurden wie bei den Zwischenhäutungstieren, obwohl Tiere 1 h nach der Häutung schon stattliche Mengen Chitin enthielten. Nach allgemeiner Auffassung werden bei der Häutung auch die inneren Skelettstrukturen gehäutet; dies zeigt auch ein Blick in das Innere einer Exuvie. Offenbar sind die von mir gefundenen Chitinmengen tatsächlich Neubildungen. Einen Beweis dafür liefern die Ergebnisse von SPECK (unveröffentlicht), der bei künstlich enthäuteten D_3-D_4-Tieren ein um etwa 50% niedrigeres Chitingewicht gegenüber frisch gehäuteten Tieren feststellte. Mit der Häutung erfolgt ein hochsignifikanter Anstieg der Einbaurate, die ungefähr einen Tag nach der Häutung ihr Maximum erreicht. Darauf folgt ein stetiger Abfall, bis sich dann nach etwa 45 Tagen die Einbaurate wieder auf das Niveau der Zwischenhäutung einstellt.

HU (1958) konnte bei Hemigrapsus nudus nach Injektion von ^{14}C-Glucose nur bei einem Nachhäutungstier (B-Stadium) eine Aktivität im Chitin feststellen. Dagegen fanden SCHEER und SCHEER (1951), daß auch bei Zwischenhäutungstieren von Panulirus ein Einbau in Chitin erfolgt. Die Befunde von HU an Hemigrapsus wurden von MEENAKSHI und SCHEER (1961) bestätigt und erweitert. Tab. 9 gibt die Angaben von MEENAKSHI und SCHEER wieder. Danach scheint die Chitinsynthese bei der Krabbe etwas anders als bei dem Flußkrebs zu verlaufen. Die Einbauraten nach der Häutung erreichen bei weitem nicht die Höhe wie bei Orconectes, und die Zwischenhäutungstiere synthetisieren kein Chitin aus Glucose. Für Orconectes geben SPECK und URICH (1969) 3 h bzw. 24 h nach der Injektion frischgehäuteter Tiere(3 bis 12 h nach der Häutung) 50 bzw. 57 % Aktivität im Chitin an - die Werte für

Zwischenhäutungstiere im Oktober belaufen sich auf 0,2 bzw. 2,2 %. Injiziertes Glutamat und Palmitat wurden unmittelbar nach der Häutung in weitaus geringerem Maße inkorporiert.

Stadium	Zeit nach der Injektion (h)	Prozent injizierter Aktivität im Chitin
A	24	7,8
A	48	14,8
B_1	48	15,3
B_2	48	10,7
C_1	48	0,7
C_2	48	0
C_3	48	0
C_4	48	0
D_1	48	0
D_2	48	0
D_3	24	Spuren
D_4	24	4,3

Tab. 9 Einbauraten von ^{14}C-Glucose in Chitin bei verschiedenen Stadien von Hemigrapsus nudus (MEENAKSHI und SCHEER 1961)

Den hier beschriebenen hohen in vivo-Einbauraten beim Flußkrebs kommen die von CROMPTON und POLAKIS (1969) bei der Diptere Lucilia cuprina beobachteten am nächsten. Nach einer Versuchsdauer von 140 min wurden bei einem pharaten Stadium kurz vor dem Schlüpfen 43% der injizierten Glucose im Chitin gefunden. Dabei stieg zu diesem Zeitpunkt die Aktivität noch an. Ein Vergleich mit den von SPECK und URICH (1969) und SCHWOCH (unveröffentlicht) beim Flußkrebs gefundenen Einbauraten (s. auch S. 50) zeigt, daß 1 h nach der Injektion diese ebenfalls noch anstiegen.

Wie ein Vergleich der Einbauraten mit dem Anstieg des Chitingewichts zeigt, deckt sich die Periode maximaler Inkorporation mit der des maximalen Anwachsens des Chitingewichts. (Tab. 10)

Tage nach der Häutung	Einbaurate	mittlerer Anstieg des Chitingewichts pro Tag
1	100	100
2	88	71
8	57	47
24	48	16
35	29	10

Tab. 10 Vergleich der Einbaurate in Chitin mit dem Anstieg des Chitingewichts. Die höchste Einbaurate und der größte Chitingewichtsanstieg wurden jeweils gleich 100% gesetzt.

2 Chitinsynthese bei Zwischenhäutungstieren

Aus den oben angeführten Arbeiten geht hervor, daß bei Zwischenhäutungstieren offensichtlich keine nennenswerte Chitinsynthese stattfindet. Die geringen Aktivitäten der C_4-Tiere in der vorliegenden Arbeit könnten auf Verunreinigungen des Chitins mit Protein beruhen. 24 h nach der Injektion waren aber immerhin etwa 2% der Glucose inkorporiert, und SPECK und URICH (1969) fanden, daß die spezifische Aktivität bei Zwischenhäutungstieren im Oktober im Protein nur etwa fünffach höher war als im Chitin. Ein langsamer Chitinturnover bei den Crustaceen in der Zwischenhäutungsphase ist durchaus denkbar, vergleicht man mit den bei Insekten erhaltenen Ergebnissen. Nach Versuchen mit der Küchenschabe Periplaneta vertreten LIPKE et al. (1965) die Meinung, daß die althergebrachte Ansicht, das einmal gebildete Chitin sei frei von Stoffwechselaktivität, modifiziert werden müsse. Sie stellten nämlich durch Tracer-Versuche fest, daß Chitinsynthese und -Resorption den ganzen Häutungscyclus über in recht beträchtlichen Ausmaßen ablaufen. Selbst kurz vor der Häutung wurde noch ^{14}C-Glucose in das Chitin eingebaut. Der Abbau von Chitin und die Verwendung als Reservesubstanz bzw. zur Synthese der neuen Kutikula waren schon früher bekannt (ZALUSKA 1959, CANDY und KILBY 1962, BADE und WYATT 1962, LOCKE 1964).

3 Enzyme der Chitinsynthese

Die Enzyme der Chitinsynthese wurden bei Arthropoden erstmals von CANDY und KILBY (1962) gefunden. An Flügelhomogenaten der Heuschrecke Schistocerca gregaria gelang es ihnen, die Enzymaktivitäten zu finden, die ausgehend von der Glucose

UDP-N-acetylglucosamin synthetisieren. Dagegen scheiterte der Versuch, die Chitinsynthetase selbst zu messen. Dies gelang JAWORSKI et al. (1963) und PORTER und JAWORSKI (1965) bei Prodenia eridania. Die maximale Einbaurate aus UDP-^{14}C-acetylglucosamin lag etwa bei 1% nach 2 h Inkubation. Ähnliche Ergebnisse bei Crustaceen wurden von CAREY (1965) berichtet: eine Chitinsynthetase aus hochtourig abzentrifugierten Partikeln der Hypodermis von Häutungstieren von Callinectes sapidus oder 3 Tage alten Larven von Artemia salina inkorporiert ungefähr 1% ^{14}C-Acetylglucosamin (in einem Fall 4%) in Chitin. Während HU (1958) bei Hemigrapsus kein UDP-acetylglucosamin finden konnte, gelang es KENT und LUNT im selben Jahr bei Carcinus maenas dieses Aminozuckernucleotid festzustellen. LUNT und KENT (1961) beschreiben dann sein Vorkommen bei mehreren Decapoden, während CAREY und WYATT (1960) bei Insekten außerdem UDP-acetylgalactosamin nachwiesen.

4 Zeitlicher Verlauf der Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivitäten, der Chitineinbauraten und der Chitingewichte

Nachdem TRAVIS (1965) für Orconectes wahrscheinlich gemacht hat, daß im Integumentgewebe zu gleicher Zeit Abbauvorgänge des alten Exoskeletts und die Synthese der neuen Exokutikula nebeneinanderlaufen, kann für den divergierenden Verlauf der Einbauraten-Aktivität und der PGI-Aktivität, wie er unter anderem aus der Abb. 1 deutlich hervorgeht, eine Deutung versucht werden. Die Aktivität der PGI läuft etwa parallel der Einbaurate der Glucose in Chitin; nur einmal weicht der Kurvenverlauf auffallend davon ab: während die Einbaurate bis zur Häutung auf einem niedrigen Niveau verharrt und erst mit der Häutung ein außerordentlich steiler Anstieg eintritt, steigt die PGI-Aktivität schon vom D_1- zum D_2-Stadium hochsignifikant an, bleibt über die restlichen D-Stadien auf diesem Plateau, wächst aber dann kurz nach der Häutung nochmals an. Das Chitingewicht verhält sich etwa umgekehrt proportional dem allgemeinen Trend der PGI-Aktivität und der Einbaurate: es sinkt ausgehend von Zwischenhäutungstieren stetig ab und erreicht nach Abwurf des alten Exoskeletts seinen tiefsten Wert; der stärkste Anstieg fällt

in die Tage nach der Häutung, danach nimmt er einen flacheren, etwa linearen Verlauf. Die Beobachtung, daß Tiere, die sich in Gefangenschaft häuten, i.a. einen dünneren und leichteren Panzer ausbilden, könnte zum Teil den bedeutenden Unterschied im Chitingewicht der Tiere am Ende der Versuchsreihe und frischgefangener C_4-Tiere erklären; nach 47 Tagen ist die Chitinsynthese aber offensichtlich noch nicht abgeschlossen.

Wie erwähnt, enthält die neue Kutikula schon bemerkenswerte Chitinmengen. Die Resorption des Chitins beginnt schon ehe sich irgendwelche morphologischen Häutungsvorkehrungen erkennen lassen (Tiere des D_0-Stadiums standen in der Mehrzahl wie die C_4-Tiere vor der ersten Häutung des Jahres). Nach vollendeter Apolyse im D_1-Stadium und Speicherung der Abbauprodukte in den Integumentgewebezellen wird offenbar durch die zu diesem Zeitpunkt erhöhte Aktivität der PGI die Chitinsynthese des neuen Exoskeletts eingeleitet. Auf die in der Hämolymphe kreisende Glucose wird dabei nicht zurückgegriffen, bzw. nur in dem Maße wie bei den Zwischenhäutungstieren. Da die Resorption des Chitins bis unmittelbar vor die Häutung fortgesetzt wird und dabei rund die Hälfte des Chitins zurückgewonnen wird, benötigen die Integumentgewebezellen erst nach der Häutung Hämolymphglucose, bzw. das evtl. daraus entstandene Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese. Zu dieser Vermutung paßt auch gut die Beobachtung, daß erst etwa 24 h nach der Häutung die maximale Einbaurate erreicht wird - obwohl in dem Zeitraum 3-24 h nach der Häutung das Chitingewicht am raschesten zunimmt (Tab. 10) und die PGI-Aktivität unmittelbar nach der Häutung ihr Maximum besitzt; bis dahin werden wahrscheinlich noch zum Teil die Vorräte der Zellen verarbeitet. Damit scheint für Orconectes bewiesen zu sein, daß eine Chitinsynthese auch schon vor der Häutung stattfindet (s. auch S. 50). Gestützt wird diese Ansicht unter anderem durch die Ergebnisse von TRAVIS (1965). Die Autorin fand bei Orconectes während der Stadien D_2-A in der neuen Exokutikulamatrix unmittelbar über der Epidermis Einlagerungen von Glykogen, sauren Mucopolysacchariden und Chitin. Gleichzeitig konnte sie hohe Konzentrationen von Glykogen, Mucopolysacchariden und alkalischer Phosphatase in den Spitzen der Epidermiszellen feststellen, während die

Lipidkonzentration niedrig war. Nach DALL (1965 a) werden bei der Garnele Metapenaeus vor der Häutung etwa 39% des Chitins wie auch des Proteins resorbiert. Bei den Decapoden soll Chitin etwa 65 - 85% des organischen Materials der Kutikula ausmachen (RICHARDS 1951), allerdings gibt DALL für Metapenaeus etwa 34% Chitin an. BADE und WYATT (1962) konnten bei der Seidenraupe den Übergang markierten Chitinmaterials über eine Häutung hinweg durch die Inkorporation des resorbierten alten Chitins direkt in die neue Kutikula verfolgen. Entsprechende Versuche werden zur Zeit beim Flußkrebs am hiesigen Institut vorbereitet.

5 Regulation der Chitinsynthese und Kohlenhydratstoffwechsel zur Zeit der Häutung

Über die Regulation der Chitinsynthese bei Crustaceen ist noch kaum etwas bekannt. Auch bei den Insekten steckt die Untersuchung dieser Frage noch in den Anfängen. Wie erwähnt wurden alle Enzyme der zur Chitinbildung führenden Schritte bei Arthropoden gefunden. Durch Versuche mit Tracern konnte der Einbau des Kohlenstoffs von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren in Chitin festgestellt werden. Die bisher bekannt gewordenen Ergebnisse zur Chitinsynthese bei Insekten sind recht widersprüchlich. Aus Untersuchungen des Hexosaminstoffwechsels an Imaginalscheiben von Drosophila melanogaster schließt FRISTROM (1968), daß zwei Schritte in den Imaginalscheiben die Kontrolle der Chitinsynthese bewirken könnten: 1.) auf der Stufe der den Hexosaminstoffwechsel einleitenden Reaktion, der Aminierung von Fructose-6-P und 2.) auf der Ebene der eigentlichen Chitinsynthese durch die Chitinsynthetase. Daß die Chitinsynthese hormonal gesteuert wird, klingt bei vielen Autoren an, jedoch läßt sich aus den vielen bruchstückhaften Andeutungen noch kein Mosaik zusammensetzen, so daß man noch weit davon entfernt ist, eine Übersicht geben zu können. FRISTROM hält es für möglich, daß die cryptocephal-Mutante von Drosophila, die sich durch ein Übermaß an Chitineinlagerung in das Integument auszeichnet, durch eine Aktivitätsänderung eines der beiden Enzyme oder der Kontrolle der Enzymsynthese bewirkt wird. So konnten KORNFELD et al. (1964) bei der Glutamin-fructose-6-P-amino-

transferase aus der Rattenleber zeigen, daß UDP-N-acetylglucosamin als Inhibitor wirkt und es sich dabei wahrscheinlich um eine allosterische Hemmung handelt.

CROMPTON und Mitarb. haben sich intensiv mit der Chitinsynthese bei der Schmeißfliege Lucilia cuprina beschäftigt und dabei auch versucht festzustellen, welche Stoffe bevorzugt dazu herangezogen werden und welche als Energiequelle dienen. Quantitative Analysen des Kohlenhydratbestandes während der Metamorphose lassen vermuten, daß das im Laufe der Entwicklung des pharaten Stadiums verschwindende Glykogen in Chitin eingebaut wird. Die Glykolyse scheint nur in sehr geringem Ausmaß abzulaufen (CROMPTON und BIRT 1967). Die Kapazität der in vitro-Glykolyse ist aber beträchtlich; offensichtlich wird die Aktivität der glykolytischen Enzyme in vivo regulatorisch eingeschränkt (CROMPTON und BIRT 1969). Die hohe Einbaurate von Glucose in Chitin und der geringe Anteil radioaktiven CO_2 in der Atemluft unterstützt diese Vermutung (CROMPTON und POLAKIS 1969). Diese Befunde stehen im Gegensatz zur allgemeinen Ansicht, daß die Glykogenabnahme während des pharaten Stadiums auf die Rolle der Kohlenhydrate als Hauptenergiequelle zurückzuführen sei (zusammenfassend WYATT 1967). CROMPTON und POLAKIS schließen aus ihren Tracer-Versuchen, daß die Ursache der Limitierung des Kohlenhydratstoffwechsels zumindest zum Teil bei der Glucose- und Fructose-6-P-Phosphorylierung liegen könnte. Während des pharaten Stadiums geht parallel dem eingeschränkten Kohlenhydratstoffwechsel eine beträchtliche Oxydation von Fettsäuren. Fettsäureoxydation senkt in manchen Säugetiergeweben den Glucoseumsatz (NEWSHOLME und GEVERS 1968)[1]; dies wurde zurückgeführt auf die Hemmung der Phosphofructokinase durch hohe Citrat- und ATP-Konzentrationen mit nachfolgender Hemmung der Hexokinase durch erhöhte Glucose-6-P-Konzentration. Es wird für möglich gehalten, daß ähnliche Regulationsmechanismen während des pharaten Stadiums von Lucilia ablaufen. Aus der Fettsäureoxydation stammt auch wohl das Acetyl-CoA für die Chitinsynthese

1 Zit. nach CROMPTON und POLAKIS (1969)

bei Lucilia. Die Befunde von SPECK und URICH (1969) über den Einbau von Palmitat in Chitin lassen auch für Orconectes die Vermutung zu, daß ein Teil des Acetyl-CoA aus den Fettsäuren stammt: 24 h nach der Häutung sind bei frischgehäuteten Tieren 4,5% in Chitin inkorporiert, bei Zwischenhäutungstieren nur 0,6%; die entsprechenden Werte für Glutamat lauten 7,6 bzw. 0,05%.

Widersprüchliche Angaben finden sich darüber, welche Stoffe als Ausgangsmaterial zur Chitinsynthese dienen. Aus Tracer-Versuchen schlossen LIPKE et al. (1965), daß Trehalose bei Periplaneta americana als Ausgangsmaterial fungiert. Bei Lucilia konnten CROMPTON und POLAKIS (1969) zeigen, daß Trehalose kein Intermediärprodukt bei der Verwertung der Hämolymphglucose sein kann; sie sehen in Glykogen die Hauptquelle. Nach BADE und WYATT (1962) deckt die Seidenraupen-Puppe ihren Bedarf überwiegend aus den Abbauprodukten der Larvenkutikula; diese konnten aber nicht bestimmt werden. Bei den Crustaceen ergibt sich ein ähnliches Bild. Nach älteren Autoren soll Glykogen als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese dienen (zusammenfassend DALL 1965b). Nach DALL (1965b) soll bei Metapenaeus ein saures Mucopolysaccharid zur Chitinsynthese dienen, das von Blutamöbocyten transportiert wird (DALL 1964). Diese Amöbocyten und Klumpen von Zellen ("tegumental glands"), die saure Mucopolysaccharide enthalten, werden dann in großer Zahl in der inneren Epidermis der Stadien D_2 und A gefunden (DALL 1965a). TRAVIS (1965) neigt wieder mehr zur Ansicht, daß Glykogen die Hauptrolle bei der Chitinsynthese spielt.

SPECK (1967) versucht ein zusammenfassendes Bild der Häutung von Orconectes zu entwerfen. Danach zeigen alle Organe, die als Speicher dienen oder das allgemeine Kohlenhydratangebot im Körper wiederspiegeln, ein Maximum des Neutralzuckergehalts in der Vorhäutungszeit bzw. unmittelbar vor der Häutung. Während der Häutung erfolgt in der Regel ein deutlicher Abfall. Die Epidermis zeigt vor der Häutung von allen Organen den stärksten Kohlenhydratanstieg. In der Hämolymphe ist zur Zeit der Häutung nur ein Anstieg der Polysaccharidfraktion zu verzeichnen. In

nahezu allen Organen wird nach der Häutung der Glucoseanteil oder der Anteil der Maltoseoligosaccharide auf Kosten der verschiedenen Polymeren erhöht. Insbesondere die Trehalosekonzentration ist kurz nach der Häutung niedrig. Ebenso wird in fast allen Organen der Zuckerphosphatanteil erhöht. Beide Erscheinungen können im Sinne einer allgemeinen Aktivierung des Kohlenhydratstoffwechsels verstanden werden. SPECK beschäftigt sich auch mit den Transportvorgängen der Kohlenhydrate während der Häutung. Der auf dem schon oft beschriebenen wechselnden Auftreten von Kohlenhydrat in der Mitteldarmdrüse und dem Integumentgewebe gefolgerte Transport von Kohlenhydrat wurde noch nie direkt gemessen. Auch sind die Befunde über die Höhe des Blutzuckers keineswegs einheitlich. Glucose kann sowohl in der freien Form wie auch als Trehalose oder Maltoseoligosaccharide transportiert werden, ebenso Galactose und Fucose als Bausteine der sauren Mucopolysaccharide. Freies Hexosamin kommt in der Hämolymphe bei frisch gehäuteten Tieren in ungefähr zehnfach höherer Konzentration vor als bei Zwischenhäutungstieren im Oktober. Gebundenes Hexosamin ist bei frischgehäuteten Tieren in doppelt hoher Konzentration zu finden als freies Hexosamin. SPECK führt weiterhin aus, daß auf die Frage nach dem Ort der Glucoseaminierung höchstwahrscheinlich nur das Integumentgewebe in Frage kommt. Dazu kommen noch Magen, Enddarm und Kiemen. Diese Ansicht wird durch die Messung der Aktivitäten der PGI bestätigt, da hochsignifikante Aktivitätsunterschiede zwischen frischgehäuteten Tieren und Zwischenhäutungstieren in den beim Aufbau einer Kutikula beteiligten Organen, Integumentgewebe, Enddarm und Kiemen, auftreten. Ebenso decken sich die Beobachtungen von SPECK, daß auch andere Organe bei frischgehäuteten Tieren eine Erhöhung des Hexosamin- bzw. N-Acetylhexosamingehalts zeigen, mit den ebenfalls deutlich höheren PGI-Aktivitäten zu dieser Zeit.

Wie schon die verschieden hohen Einbauraten zeigten, weicht der Ablauf der Chitinsynthese bei verschiedenen Decapoden offensichtlich voneinander ab (s. auch S. 50). Schon SCHEER (1958)[1]

1 Zit. nach HU (1958)

deutet an, daß es zwischen Hemigrapsus und Panulirus grundlegende Unterschiede im Häutungscyclus geben könnte. Meine Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Stufe der Hexosephosphataminierung eine regulierende Schlüsselposition einnehmen könnte, da die Aktivität der PGI nicht nur in den beim Aufbau der Kutikula beteiligten Organen hochsignifikant ansteigt, sondern auch nach der Häutung weitgehend parallel der Einbaurate der Glucose in Chitin verläuft. Diese Ansicht vertritt auch KRISTON (1968) nach seinen Untersuchungen an Drosophila. Der signifikante Anstieg der PGI-Aktivität im Integumentgewebe vor der Häutung und während der Häutung scheint auf einer de-novo-Synthese dieses Enzyms zu beruhen: durch gemeinsame Inkubationen von Homogenaten niedriger (D_C-Tiere) und hoher Aktivität (A-Tiere) konnte weder ein Aktivator noch ein Inhibitor gefunden werden.

Da ich beträchtliche Mengen Chitin unmittelbar nach der Häutung feststellen konnte, die Einbaurate der Glucose ins Chitin sich bis dahin jedoch nicht von der der Zwischenhäutungstiere unterschied und nicht parallel dem Anstieg der PGI-Aktivität anstieg, nehme ich an, daß erst nach dem Verbrauch der Abbauprodukte der alten Kutikula in nennenswertem Umfang Hämolymphglucose zur Chitinsynthese verwendet wird. Die Chitinsynthese umgeht offensichtlich den für die Hämolymphglucose zugänglichen Glucosepool; erst nach der Häutung erfolgt die Umschaltung auf diesen. Die Zunahme der Einbauraten nach der Häutung bis zum Erreichen eines Maximums nach 24 h ließe sich mit einer gewissen Anlaufzeit dieses Umschaltvorganges erklären. Nach GRASZYNSKI (1968c) verteilt sich 5 h nach Injektion von ^{14}C-Glucose in die Hämolymphe von Zwischenhäutungstieren von Flußkrebsen die Aktivität auf alle untersuchten Organe. Die spezifische Radioaktivität der einzelnen Organe ist dabei sehr verschieden hoch; das Integumentgewebe zeigt einen besonders raschen Umsatz. Leider liegen für den Häutungscyclus keine Versuchsreihen vor.

Die von COLLATZ(1968) beschriebenen jahreszeitlichen Veränderungen des Lipidspektrums bei Orconectes, Maximum des

Lipidgehalts kurz vor der Häutung, danach steiler Abfall (mit einer etwas zeitlich verschobenen Parallelität der Veränderungen des Kohlenhydratgehalts) legen zusammen mit der hohen Glucoseeinbaurate in Chitin und anderen oben aufgeführten Gründen die Vermutung nahe, daß beim Flußkrebs ähnliche Regulationsmechanismen ablaufen wie die von CROMPTON und POLAKIS (1969) für Lucilia angenommenen. Wie COLLATZ schreibt, hat es den Anschein, als ob die Fettreserven für den Häutungsprozess "zentral gelagert" (Mitteldarmdrüse, Integumentgewebe) werden, um als Energiereserve zur Verfügung zu stehen. Die Kohlenhydrate scheinen damit zumindest zu dieser Zeit als Energiequelle keine große Rolle zu spielen und hauptsächlich als Ausgangsmaterial zur Chitinsynthese zu dienen.

ZUSAMMENFASSUNG

1 Die Aktivitäten von 15 Enzymen der Monosaccharidumwandlung wurden jeweils in bis zu 11 Organen von Orconectes limosus bestimmt.

2 Von den Enzymen des Pentosephosphat-cyclus bilden die Transaldolase und die Transketolase in den untersuchten Organen eine proportionskonstante Enzymgruppe, nicht dagegen die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-dehydrogenase. Nach ihren organspezifischen Proportionen besitzen Antennendrüse, Hoden und Bauchmark hohe Kapazitäten des oxydativen Pentosewegs; Hoden und Bauchmark zeigen überdies die höchsten Kapazitäten des nichtoxydativen Pentosewegs.

3 Von den Enzymen des Galactosestoffwechsels liegt die UDP-glucose-4-epimerase im Enddarm mit den höchsten Aktivitäten vor; die nur mit sehr niedrigen Aktivitätswerten gefundene Hexose-1-phosphat-uridyltransferase zeigt in Kiemen, Integumentgewebe und Mitteldarmdrüse ihre höchsten Konzentrationen.

4 Bei der Bestimmung der Fructosediphosphataldolase und der 1-Phosphofructaldolase wurden sehr unterschiedliche Fructosediphosphat/Fructose-1-phosphat-Quotienten gefunden. Nach LEBHERZ und RUTTER (1969) muß man aber annehmen, daß es sich dabei nicht um gewebsspezifische Aldolasevarianten wie bei den Wirbeltieren sondern um proteolytische Modifikationen handelt. Die Umsetzung von Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat wird in Schwanzmuskel und Herz mit den höchsten Geschwindigkeiten katalysiert.

5 Von den Oxydoreductasen wurden Sorbitdehydrogenase und Aldosereductase als Enzyme der über nichtphosphorylierte Produkte verlaufenden Fructose-Glucose-Umwandlung in der Antennendrüse gefunden. Glucose- bzw. Galactosedehydrogenase, UDP-glucosedehydrogenase sowie die bakteriellen Polyol-dehydrogenasen Mannit-1-phosphat-dehydrogenase und Sorbit-6-phosphat-dehydrogenase konnten in Antennendrüse und Mitteldarmdrüse nicht nachgewiesen werden.

6 Im Zusammenhang mit der Chitinsynthese wurde die Phosphoglucosamin-isomerase untersucht. In Integumentgewebe, Kiemen und Enddarm lagen die Aktivitäten bei Tieren unmittelbar nach der Häutung hochsignifikant höher als bei Zwischenhäutungstieren.

Durch einen Vergleich der in vitro gemessenen Phosphoglucosamin-isomerase-Aktivität im Integumentgewebe von Flußkrebsen 15 verschiedener Häutungsstadien mit der Einbaurate markierter Glucose in Chitin sowie einer Chitinbestandsaufnahme kann geschlossen werden, daß die Phosphoglucosaminisomerase ein die Chitinsynthese steuerndes Schlüsselenzym ist. Vor der Häutung wird der der Hämolymphglucose zugängliche Glucosepool nicht zur Chitinsynthese herangezogen; erst nach der Häutung erfolgt eine Umschaltung.

Die extrem hohen Einbauraten von Glucose in Chitin - einen Tag nach der Häutung ist 1 h nach der Injektion schon über die Hälfte in Chitin inkorporiert - sprechen dafür, daß Kohlenhydrate als Energiequelle zumindest zu dieser Zeit keine große Rolle spielen; diese Aufgabe fällt wahrscheinlich den Lipiden zu.

LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMOWITZ, A.A., F.L. HISAW and D.N. PAPANDREA (1944): The occurence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. Biol. Bull. 86 1-5

BADE, M.L. and G.R. WYATT (1962): Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. I. Deposition and utilization of nutrient reserves. Biochem. J. 83 470-478

BEECHEY, R.B., D.H. BURRIN and M.I. BAXTER (1963): Mitochondria from the crab, Carcinus maenas. Nature 198 1277-1279

BELITZ, H.J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht 3 83-103

BERGREEN, P.W., V.R. MEENAKSHI and B.T. SCHEER (1961): The oxidation of glucose by crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 2 218-220

BETZ, A., K. BRINKMANN und R. HINRICHS (1968): Welchen Informationswert haben in Rohextrakten gemessene Enzymaktivitäten für physiologische Probleme? Planta 80 77-81

BINNS, R. (1969): The physiology of the antennal gland of Carcinus maenas (L.). I-V.J. exp. Biol. 51 1-45

BRUNS, F.H., E. NOLTMANN und E.VAHLHAUS (1958): Über den Stoffwechsel von Ribose-5-phosphat in Hämolysaten. Biochem. Z. 330 483-496

BURRIN, D.H. and R.B. BEECHEY (1964): The spectrophotometric dissection of the electron transfer system of mitochondria isolated from the hepatopancreas of Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol. 12 245-258

BURRIN, D.H. and R.B. BEECHEY (1966): The nature and metabolic role of the ubiquinone present in mitochondria isolated from the common shore crab, Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol. 19 745-757

CANDY, D.J. and B.A. KILBY (1962): Studies on chitin synthesis in the desert locust. J. exp. Biol. 39 129-140

CAREY, F.G. (1965): Chitin synthesis in vitro by crustacean enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 16 155-158

CAREY, F.G. and G.R. WYATT (1960): Uridine diphosphate derivates in the tissues and hemolymph of insects. Biochem. Biophys. Acta 41 178-179

COLLATZ, K.G. (1968): Das Lipidspektrum des Flußkrebses Orconectes limosus und seine jahreszeitlichen Veränderungen. Diss. Berlin

COMB, D.G. and S. ROSEMAN (1958): Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. J. biol. Chem. 232 807-827

CROMPTON, M. and L.M. BIRT (1967): Changes in the amounts of carbohydrates, phosphagen, and related compounds during the metamorphosis of the blowfly, Lucilia cuprina. J. Insect Physiol. 13 1575-1592

CROMPTON, M. and L.M. BIRT (1969): Changes in the in vitro activity of glycolytic enzymes during metamorphosis of the blowfly Lucilia cuprina. J. Insect Physiol. 15 1119-1127

CROMPTON, M. and S.E. POLAKIS (1969): The labelling of tissue components during the pharate adult life of Lucilia cuprina, after injection of U-^{14}C-Glucose. J. Insect Physiol. 15 1323-1329

CUATRECASAS, P. and S. SEGAL (1966): Mammalian galactose dehydrogenase. J. biol. Chem. 241 5904-5918

DALL, W. (1964): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus mastersii (Haswell) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). I. Blood constituents. Austr. J. Mar. Freshwater Res. 15 145-161

DALL, W. (1965a): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). III. Composition and structure of the integument, Austr. J. Mar. Freshwater Res. 16 13-23

DALL, W. (1965b): Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). IV. Carbohydrate metabolism. Austr. J. Mar. Freshwater Res. 16 163-180

DESAI, B.M., V.V. MODI and V.K. SHAH (1969): Studies on polyol metabolism in Aspergillus niger. III. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase. Arch. Mikrobiol. 67 16-20

DISTLER, J.J., J.M. MERRICK and S.ROSEMAN (1958): Glucosamine metabolism. III. Preparation and N-acetylation of crystalline D-glucosamine- and D-galactosamine-6-phosphoric acids. J. biol. Chem. 230 497-509

DOUNCE, A., R.F. WITTER, K.J. MONTY, S. PATE and M.A. COTTONE (1955): A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1 139

DRACH, P. (1939): Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Decapodes. Ann. Inst. océanograph. Monaco 19 103-391

FRISTROM, J.W. (1968): Hexosamine metabolism in imaginal disks of Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol. 14 729-740

GEORGI, R. (1969): Feinstruktur und Bildung peritrophischer Membranen bei Crustaceen. Diss. Berlin

GERLACH, U. (1962): Sorbitdehydrogenase. In H.U. BERGMEYER (Edit.): Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie GmbH 761-764

GHOSH, S., H.J. BLUMENTHAL, E. DAVIDSON and S. ROSEMAN (1960): Glucosamine metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine-6-phosphate. J. biol. Chem. 235 1265-1273

GHOSH, S. and S. ROSEMAN (1962): L-glutamine-D-fructose 6-phosphate transamidase from Escherichia coli. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. V. New York and London, Academic Press 414-417

GRASZYNSKI, K. (1968a): Über den Weg der Fettsäuresynthese beim Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque. Verh. Dtsch. Zool. Ges., Innsbruck 1968 619-628

GRASZYNSKI, K. (1968b): Enzyme des Fettsäureabbaus in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque. Z. vergl. Physiol. 60 427-439

GRASZYNSKI, K. (1968c): Über die Verteilung der Radioaktivität auf die Organe des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis Say) nach Injektion von n[14]C-Glucose in die Hämolymphe. Z. vergl. Physiol. 59 110-116

GRASZYNSKI, K. (1970): Intrazelluläre Lokalisation von Enzymen des Flußkrebses. Z. vergl. Physiol. 66 107-122

DE LA HABA, G., I.G. LEDER and E. RACKER (1955): Crystalline transketolase from Bakers' yeast: isolation and properties. J. biol. Chem. 214 409-426

VAN HANDEL, E. (1969): The equilibrium reaction sorbitol = fructose in the intact mosquito. Comp. Biochem. Physiol. 29 1023-1030

HARTENSTEIN, R. (1964): Histochemical and spectrophotometrical studies on several dehydrogenases of carbohydrate metabolism in Oniscus asellus. J. Insect Physiol. 10 623-631

HÅSTEIN, T. and W. VELLE (1969): Purification and properties of aldolase reductases from the placenta and the seminal vesicle of the sheep. Biochim. Biophys. Acta 178 1-10

HAYMAN, S. and J.H. KINOSHITA (1965): Isolation and properties of lens aldolase reductase. J. biol. Chem. 240 877-882

HERS, H.G. (1960): L'aldose-réductase. Biochim. Biophys. Acta 37 120-126

HOCHACHKA, P.W., J.M. TEAL and M. TELFORD (1962): Pathways of carbohydrate metabolism in lobster hepatopancreas. Canad. J. Biochem. Physiol. 40 1043-1050

HOLLMANN, S. (1964): Polyol-Dehydrogenasen, Dehydrogenasen von On- und Uronsäuren, Glucose-Dehydrogenasen. In HOPPE-SEYLER, THIERFELDER (Edit.): Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. VIA. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, Springer Verlag 704-733

HU, A.S.L. (1958): Glucose metabolism in the crab, Hemigrapsus nudus. Arch. Biochem. Biophys. 75 387-395

HUGGINS, A.K. (1966): Intermediary metabolism in Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol. 18 283-290

JANTZEN, H. (1967): Die Aktivitäten von Enzymen des Glykogen- und Trehalosestoffwechsels in den einzelnen Organen des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque und Kontrollmechanismen des Glykogenstoffwechsels im Schwanzmuskel. Diss. Berlin

JAWORSKY E., L. WANG and G. MARCO(1963): Synthesis of chitin in cell-free extracts of Prodenia eridania. Nature 198 790

JENKIN, P.M. and H.E. HINTON (1966): Apolysis in arthropod moulting cycles. Nature 211 871

KALCKAR, H.M. (1958): Uridinediphospho galactose: metabolism, enzymology, and biology. In F.F. NORD (Edit.): Advances in enzymology 20. New York and London, Interscience Publishers 111-134

KELLER, R. (1964): Die Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse und des Citronensäurecyclus in den einzelnen Organen des Flußkrebses Cambarus affinis SAY. Diss. Berlin

KELLER, R. (1965): Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharidstoffwechsels beim Flußkrebs Cambarus affinis SAY. Z. vergl. Physiol. 51 49-59

KELLER, R. (1966): Über eine hormonale Regulation der Glykogensynthese beim Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis SAY). Verh. Dtsch. Zool. Ges., Göttingen 1966, Zool. Anz. Suppl. 30 272-279 (1967)

KELLER, R. (1969a): Untersuchungen zur Artspezifität eines Crustaceenhormons. Z. vergl. Physiol. 63 137-145

KELLER, R. (1969b): Zur hormonalen Blutzuckerregulation bei dekapoden Crustaceen. Habilitationsschrift Berlin

KENT, P.W. and M.R. LUNT (1958): An aminosugar nucleotide from Carcinus maenas. Biochim. Biophys. Acta 28 657-658

KERMACK, W.O., H. LEES and J.D. WOOD (1954): Enzymes of lobster tissues. Biochem. J. 57 XXII-XXIII

KLEINHOLZ, L.H. and B.C. LITTLE (1949): Studies in the regulation of blood sugar concentrations in crustaceans. I. Normal values and experimental hyperglycemia in Libinia emarginata. Biol. Bull. 96 218-227

KORNFELD, S., R. KORNFELD, E.F. NEUFELD and P.J. O'BRIEN (1964): The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. Proc. nat. Acad. Sci. USA 52 371-379

LEBHERZ, H.G. and W.J. RUTTER (1969): Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. Biochem. 8 109-121

LELOIR, L.F. and C.E. CARDINI (1962): Glucosamine-6-phosphate deaminase from pig kidney. In S.P. COLOWICK and N.O.KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. V. New York and London, Academic Press 418-422

LEUTHARDT, F. (1966): Aldolasen. In HOPPE-SEYLER, THIERFELDER (Edit.): Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse VI C. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, Springer Verlag 607-623

LIPKE, H., B. GRAVES and S. LETO (1965): Polysaccharide and glycoprotein formation in the cockroach. II. Incorporation of D-Glucose-^{14}C into bound carbohydrate. J. biol. Chem. 240 601-608

LISS, M., S.B. HORWITZ, and N.O. KAPLAN (1962): D-Mannitol 1-phosphate dehydrogenase and D-sorbitol 6-phosphate dehydrogenase in Aerobacter aerogenes.
J. biol. Chem. 237 1342-1350

LOCKE, M. (1964): The structure and formation of the integument in insects. In M. ROCKSTEIN (Edit.): The physiology of insecta 3. New York and London, Academic Press, 379-470

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193 265-275

LUNT, M.R. and P.W. KENT (1961): Evidence for the occurence of uridine diphosphate N-acetylglucosamine in Crustacean tissues.
Biochem. J. 78 128-134

MAHLER, H.R. and E.H. CORDES (1966): Biological Chemistry.
Publ. by HARPER and ROW, New York, Evanston and London, and J. WEATHERHILL, Inc., Tokyo.

MATTENHEIMER, H. (1966): Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium.
Berlin, Walter de Gruyter & Co.

MAXWELL, E.S. (1961): Enzymic epimerizations. In P.D. BOYER, H. LARDY and K. MYRBÄCK (Edit.): The Enzymes 5. New York and London, Academic Press 443-453

MAXWELL, E.S., K. KURAHASHI and H.M. KALCKAR (1962): Enzymes of the Leloir pathway. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. V, New York and London, Academic Press 174-189

McWHINNIE, M.A. and A.S. CHUA (1964): Hormonal regulation of crustacean tissue metabolism.
Gen. comp. Endocrinol. 4 624-633

McWHINNIE, M.A. and A.J. CORKILL (1964): The hexosemonophosphate pathway and its variation in the intermolt cycle in crayfish.
Comp. Biochem. Physiol. 12 81-93

McWHINNIE, M.A. and P.N. SALLER (1960): Analysis of the blood sugars in the crayfish Orconectes virilis.
Comp. Biochem. Physiol. 1 110-122

MEENAKSHI, V.R. and B.T. SCHEER (1961): Metabolism of glucose in the crabs Cancer magister and Hemigrapsus nudus.
Comp. Biochem. Physiol. 3 30-41

METZGER, R.P., S.S. WILCOX and A.N. WICK (1965): Subcellular distribution and properties of hepatic glucose dehydrogenases of selected vertebrates. J. biol. Chem. 240 2767-2771

MUNDAY, K.A. and B.D. THOMPSON (1962): The preparation and properties of sub-cellular respiring particles (mitochondria) from the hepatopancreas of Carcinus maenas.
Comp. Biochem.Physiol. 5 95-112

NAKADA, H.I. (1966): Phosphoglucosamine isomerase from Proteus vulgaris. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. IX. New York and London, Academic Press 575-579

NEILAND, K.A. and B.T. SCHEER (1953): The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of Hemigrapsus nudus. Physiol. comp. et oecol. 3 321-336

NOVELLO, F. and P. McLEAN (1968): The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Biochem.J. 107 775-791

PETTE, D. (1965): Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel. Naturwiss. 52 597-616

PETTE, D. (1968): Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels. In F.W. SCHMIDT (Edit.): Praktische Enzymologie. Bern und Stuttgart, H. Huber

POGELL, B.M. (1962): Glucosamine 6-phosphate formation from glutamine (rat liver). In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. V. New York and London, Academic Press 408-413

PONTREMOLI, S. and E. GRAZI (1966): 6-Phosphogluconate dehydrogenase-crystalline. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. IX. New York and London, Academic Press 137-141

PONTREMOLI, S. and E. GRAZI (1969): Hexose-monophosphate oxidation. In M. FLORKIN and E.H. STOTZ (Edit.): Comprehensive biochemistry 17. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company 163-189

PORTER, C.A. and E.G. JAWORSKY (1965): Biosynthesis of chitin during various stages in the metamorphosis of Prodenia eridania. J. Insect Physiol. 11 1151-1160

PUYEAR, R.L. (1967): The glucuronic acid pathway in the blue crab, Callinectes sapidus Rathbun: The enzymes of the UDP-glucose to glucuronic acid portion of the pathway. Comp. Biochem. Physiol. 20 499-508

PUYEAR, R.L., C.H. WANG and A.W. PRITCHARD (1965): Catabolic pathways of carbohydrate in the intermolt crayfish, Pacifastacus leniusculus. Comp. Biochem. Physiol. 14 145-153

RAMAMURTHI, R., M.W. MUMBACH and B.T. SCHEER (1968): Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. Comp. Biochem. Physiol. 26 311-319

RENAUD, L. (1949): Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Decapodes. Ann. Inst. Océanog. Paris 24 259-357

REX, S.C., J.P. WEAVER and A.I. WINEGRAD (1969): The distribution of polyol: NADP oxidoreductase in mammalian tissues. Biophys. Res. Commun. 37 347-353

RICHARDS, A.G. (1951): The integument of arthropods. Minneapolis, Univ. of Minnesota Press.

ROWLEY, P.T., O. TCHOLA and B.L. HORECKER (1964): The mechanism of action of aldolases. Arch. Biochem. Biophys. 107 305-312

SCHEER, B.T. (1957): The hormonal control of metabolism in decapod crustaceans. In B.T. SCHEER (Edit.): Recent advances in invertebrate physiology. Eugene, Oregon, Univ. of Oregon Publ. 213-227

SCHEER, B.T. (1959): The hormonal control of metabolism in crustaceans. IX. Carbohydrate metabolism in the transition from intermoult to premoult in Carcinides maenas. Biol. Bull. 116 175-183

SCHEER, B.T. and M.A.R. SCHEER (1951): Blood sugar in spiny lobsters. Part 1 of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. Physiol. comp. Oecol. 2 198-209

SCHIWARA, H.W., W. DOMSCHKE und G.F. DOMAGK (1968a): Differenzierung verschiedener Zuckerdehydrogenasen in der Schweineleber durch Disk-Elektrophorese und Ionenaustausch-Chromatographie. HOPPE-SEYLER's Z. 349 1575-1581

SCHIWARA, H.W., W. DOMSCHKE und G.F. DOMAGK (1968b): Das Verteilungsmuster der Zuckerdehydrogenasen in der Säugetierleber. HOPPE-SEYLER's Z. 349 1582-1585

SCHWABE, C.W., B.T. SCHEER and M.A.R. SCHEER (1952): Tissue oxydations in crustaceans. Part 3 of the hormonal control of metabolism in crustaceans. Physiol. comp. Oecol. 2 327-338

SPECK, U. (1967): Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderungen im Jahresablauf. Diss. Berlin

SPECK, U. und K. URICH (1969): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs Orconectes limosus: Einbau von Glucose-U-^{14}C, Glutamat-U-^{14}C und Palmitat-U-^{14}C in die verschiedenen Stoffklassen. Z. vergl. Physiol. 63 395-404

STEVENSON, J.R. (1968): Metecdysial molt staging and changes in the cuticle in the crayfish Orconectes sanborni (Faxon). Crustaceana 14 169-177

STEVENSON, J.R., R.H. GUCKERT and J.D. COHEN (1968): Lack of correlation of some proecdysial growth and developmental processes in the crayfish. Biol. Bull 134 160-175

STRECKER, H.J. and S. KORKES (1952): Glucosedehydrogenase. J. biol. Chem. 196 769-784

STROMINGER, J.L., E.S. MAXWELL and H.M. KALCKAR (1957): Determination of UDPG and UTP by means of UDPG Dehydrogenase. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Edit.): Meth. Enzymol. III. New York and London, Academic Press 974-976

TAN, E.L. and T. WOOD (1969): Enzymes of the pentose phosphate cycle in muscles of rat, ox, frog, lobster, chicken, northern pike and carp, and Ehrlich ascites cells. Comp. Biochem. Physiol. 31 635-643

TRAVIS, D.F. (1965): The deposition of skeletal structures in the crustacea. 5. The histomorphological and histochemical changes associated with the development and calcification of the branchial exoskeleton in the crayfish, Orconectes virilis Hagen. Acta histochem. 20 193-222

URICH, K. (1958): Über die Funktion des Regenwurm-Chloragogs, insbesondere über Fettresorption und Fettspeicherung bei Lumbricus terrestris L. Z. vergl. Physiol. 41 342-363

URICH, K. (1961): Mitteldarmdrüsen und Insektenfettkörper als Zentralorgane des Stoffwechsels. Erg. Biol. 24 156-184

URICH, K. (1964): Die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse im Metazoenorganismus. 1. Internationales Symposion über Probleme der quantitativen Biologie des Stoffwechsels. Helgoländer wiss. Meeresunters. 9 150-157

URICH, K. (1967): Aminosäurestoffwechsel in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus: Transaminierung, oxydative und nichtoxydative Desaminierung. Z. vergl. Physiol. 56 95-110

URICH, K. (1968): Die Biochemie der decapoden Crustaceen. Verh. Dtsch. Ges. Zool., Innsbruck 1968 601-619

VENKATARAMAN, R. und E. RACKER (1961): Mechanism of action of transaldolase. I. Crystallization and properties of yeast enzyme. J. biol. Chem. 236 1876-1882

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN (1936): Pyridin, der Wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnucleotide). Biochem. Z. 287 291-328

WENZL, H. (1969a): Sorbitdehydrogenase bei Insekten. Z. vergl. Physiol. 62 411-412

WENZL, H. (1969b): Die Verwertung von Glucose und Fructose im Ruhestoffwechsel von Calliphora erythrocephala. Z. vergl. Physiol. 65 340-350

WILSON, D. (1965): Purification of uridine diphosphoglucose dehydrogenase from calf liver. Analyt. Biochem. 10 472-478

WOLTER, S. (1966): Isolierung und Charakterisierung von zwei Hexokinasen unterschiedlicher Spezifität aus dem Flußkrebs Orconectes limosus (Rafinesque). Diss. Berlin

WYATT, G.R. (1967): The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. In J.W.L. BEAMENT, J.E. TREHERNE and V.B. WIGGLESWORTH (Edit.): Adv. in Ins. Physiol. 4. London and New York, Acad. Press 287-360

ZALUSKA, H. (1959): Glycogen and chitin metabolism during development of the silkworm (Bombyx mori L.) Acta biol. exp., Lodz 19 339-351

ZANDEE, D.I. (1966): Metabolism in the crayfish Astacus astacus (L.) II. The energy-yielding metabolism. Arch. internat. Physiol. Biochim. 74 45-57

A N H A N G

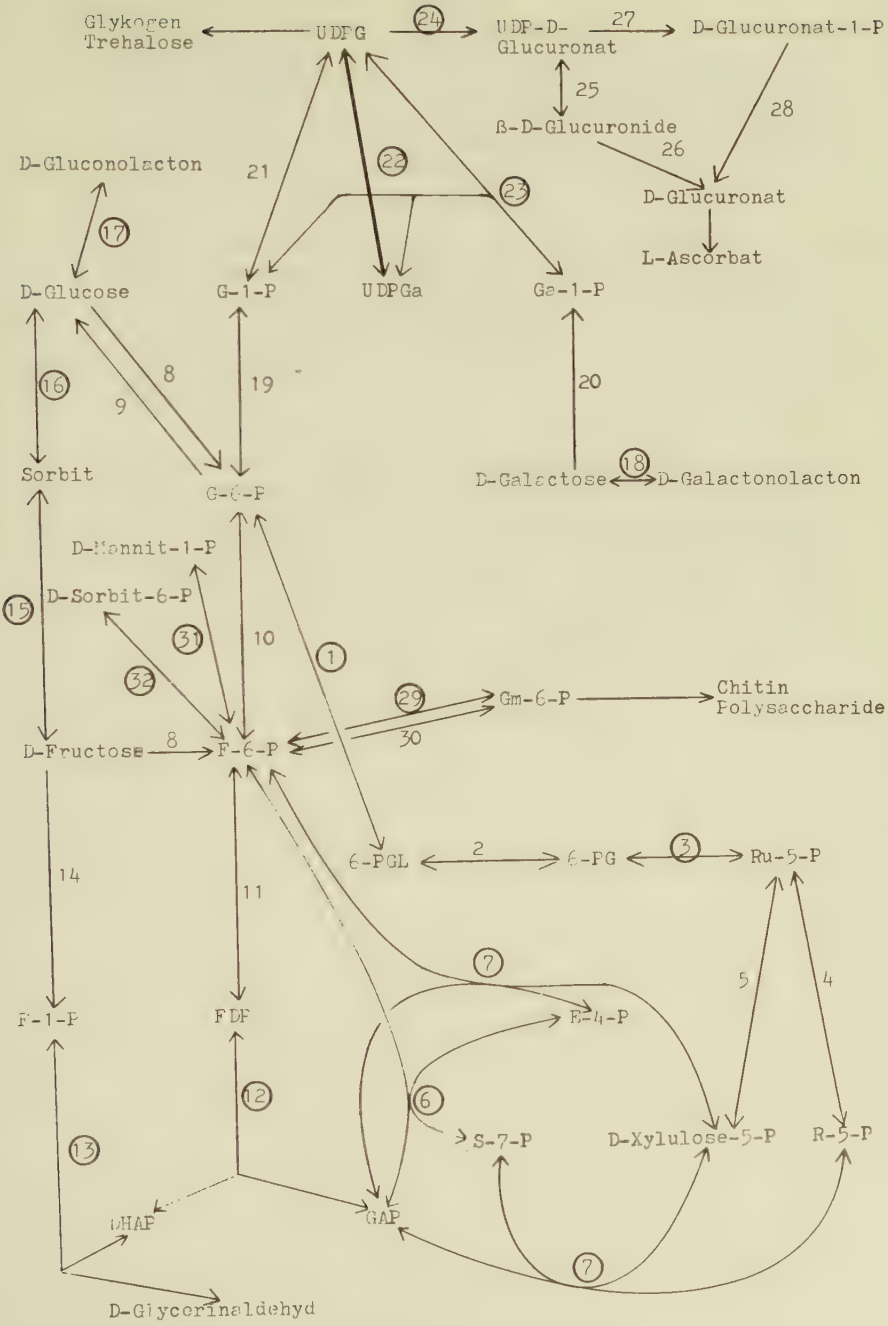
Anhang: Reaktionsschema der untersuchten Enzyme sowie einiger anderer damit in Beziehung stehender Reaktionen.

Substratabkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Die in Kreise eingeschlossenen Zahlen markieren die Reaktionen, die durch Aktivitätsbestimmung der zugehörigen Enzyme untersucht wurden.

1 Glucose-6-P-DH (EC: 1.1.1.49)
2 6-Phospho-glucono-lactonase (EC: 3.1.1.17)
3 6-Phosphogluconat-DH (EC: 1.1.1.44)
4 Ribose-P-isomerase (EC: 5.3.1.6)
5 Ribulose-P-3-epimerase (EC: 5.1.3.1)
6 Transaldolase (EC: 2.2.1.2)
7 Transketolase (EC: 2.2.1.1)
8 Hexokinase (EC: 2.7.1.1)
9 Phosphatase (EC: 3.1.3.1; 3.1.3.2)
10 Phosphoglucose-isomerase (EC: 5.3.1.9)
11 Phosphofructokinase (EC: 2.7.1.11)
12 Aldolase (EC: 4.1.2.13)
13 1-Phosphofructaldolase (EC: 4.1.2.7)
14 Ketohexokinase (EC: 2.7.1.3)
15 Sorbit-DH (EC: 1.1.1.14)
16 Aldosereductase (EC: 1.1.1.21)
17 Glucose-DH (EC: 1.1.1.47)
18 Galactose-DH (EC: 1.1.1.48)
19 Phosphoglucomutase (EC: 2.7.5.1)
20 Galactokinase (EC: 2.7.1.6)
21 UDPG-pyrophosphorylase (EC: 2.7.7.9)
22 UDP-glucose-4-epimerase (EC: 5.1.3.2)
23 Hexose-1-P-uridyltransferase (EC: 2.7.7.12)
24 UDPG-DH (EC: 1.1.1.22)
25 UDP-glucuronyl-transferase (EC: 2.4.1.17)
26 ß-Glucuronidase (EC: 3.2.1.31)
27 UDP-glucuronat-pyrophosphatase (EC: 3.6.1.9)
28 Glucuronat-1-P-phosphatase (EC: 3.1.3.1)
29 Phosphoglucosamin-isomerase (EC: 5.3.1.10)
30 Glutamin-fructose-6-P-aminotransferase (EC: 2.6.1.16)
31 Mannit-1-P-DH (EC: 1.1.1.17)
32 Sorbit-6-P-DH (EC: 1.1.1.c)

Reaktionsschema unter Verwendung der "Biochemical Pathways" der Fa. Boehringer, Mannheim


Glykogen
Trehalose
UDPG
24
UDP-D-
Glucuronat
27
D-Glucuronat-1-P
25
ß-D-Glucuronide
28
26
D-Gluconolacton
21
22
23
D-Glucuronat
17
L-Ascorbat
D-Glucose
G-1-P
UDPGa
Ga-1-P
8
9
19
20
16
Sorbit
G-6-P
D-Galactose
18
D-Galactonolacton
D-Mannit-1-P
D-Sorbit-6-P
15
31
10
1
32
29
Gm-6-P
Chitin
Polysaccharide
30
D-Fructose
8
F-6-P
6-PGL
2
6-PG
3
Ru-5-P
14
11
7
5
4
F-1-P
FDP
F-4-P
12
6
S-7-P
D-Xylulose-5-P
R-5-P
13
DHAP
GAP
7
D-Glycerinaldehyd

Lebenslauf

Am 17. November 1941 wurde ich, Rainer Lang, als Sohn des kaufm. Angestellten Max Lang und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Eisemann, in Stuttgart geboren. In Schorndorf besuchte ich von 1948 bis 1952 die Grundschule und anschließend das dortige mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium, an dem ich im Frühjahr 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Zoologie an der Freien Universität Berlin. Dort bestand ich im Juli 1966 die Diplomvorprüfung in Biologie und begann im Winter 1967/68 am II. Zoologischen Institut mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich.

Meine akademischen Lehrer waren in Zoologie die Herren Professoren Brandenburg, Görner, Günther, Herter, Kemper, Kümmel, Peters, Peus, Ulrich und Urich, in Botanik die Herren Professoren Eckardt und Reinert. Genetik hörte ich bei Herrn Professor Lüers, Physik bei Herrn Professor Lassen, Chemie bei den Herren Professoren Broser, Jahr, Manecke und Riemschneider sowie Mathematik bei Herrn Professor Ueberreiter.

Seit Mai 1969 bin ich mit der Auslandskorrespondentin Margit Lang, geb. Ulrich, verheiratet.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33